



**RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA
RECHERCHE SCIENTIFIQUE**

UNIVERSITE SAAD DAHLEB BLIDA 1

FACULTE DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE

DEPARTEMENT DE BIOLOGIE ET PHYSIOLOGIE CELLULAIRE

MEMOIRE DE FIN D'ETUDES

En vue de l'obtention du diplôme de master en science de la nature et de la vie

Filière : Sciences Biologiques

Option : Génétique

Thème :

Etude transcriptomique de l'expression des micro-ARN dans la cirrhose biliaire primitive

Présenté par :ARAAR Meriem

Soutenu devant le jury :

Présidente : M^{me} CHERRALLAH A Maitre conférence B Blida 1

Examineur : M^r BENYAHIA N Maitre conférence B Blida 1

Promotrice : M^{me} AISSANI R Maitre conférence B Blida 1

Co-Promoteur : M^r SENINET M.E

Année universitaire 2020-2021

REMERCIEMENTS

Je remercie en premier lieu Dieu le tout puissant de m'avoir prêté la force et le courage de mener à bien ce travail.

Ma gratitude s'adresse aussi à mes parents (ma mère pour son soutien inconditionnel, et feu mon père de m'avoir positivement influencé et encouragé tout au long de mon cursus scolaire).

Je n'oublie pas l'aide de mes professeurs sans qui ce mémoire n'aurait pas pu voir le jour j'ai nommé : ma promotrice **Mme Aissani** pour sa sympathie et son aide précieuse, mon CO-promoteur **Mr Seninet** pour sa patiente collaboration et sa totale implication, mon Professeur **Mr Mohamed Said** pour ses précieux conseils tout au long de ma spécialité.

Je remercie également mes professeurs et membres du jury qui ont accepté d'examiner et d'évaluer mon travail : la présidente du jury **Mme Cherrallah** et l'examineur **Mr Benyahia**.

Dédicace :

Je dédie ce travail à feu mon père (que dieu ait son âme) qui m'a toujours encouragé à aller de l'avant, à ma mère pour son aide précieuse et son soutien inconditionnel, à mes chers frères, mes oncles et tantes, mes cousines et cousins, mes amis et à toutes les personnes qui ont contribué de près ou de loin à ma réussite.

Meriem

Résumé :

La cirrhose biliaire primitive est une maladie auto-immune qui touche les petits canaux biliaires intra-hépatiques. La CBP favorise une destruction des cellules épithéliales biliaires, et elle est caractérisée par la présence d'auto anticorps anti-mitochondriaux (AMA), ainsi que les anticorps anti-nucléaire (FAN).

L'objectif dans la présente étude est d'identifier les gènes des micro-RNA exprimés de manière différentielle, d'identifier le rôle biologique de leurs gènes cible et l'interaction entre ces derniers. Pour cela trois groupes d'individus ont été sélectionnés : quinze(15) patients atteints de cirrhose biliaire primitive (CBP), Sept (7) patients atteints de stéatose hépatique non alcoolique (NASH) et Six(6) témoins sains.

Neuf (9) micro-RNA exprimés de manière différentielle ont été décelés il s'agit du : miR-122, miR-15A, miR-30e, miR-192 miR-99A, miR-LET7BHG,miR-LET7, miR-LET7 C et miR503. Parmi ces gènes 6 micro-ARN ont été retrouvés sous exprimés et 3 micro-ARN sur exprimés chez les patients CBP. Ce qui suggère que les premiers ont un rôle protecteur et les seconds un rôle de régulation négatif dans cette pathologie.

Par ailleurs, sept gènes candidats à la CBP sont ciblés par les micro-RNA ont été décelés, à savoir : ADAM10, IGF1R, CCNG1, ADAM17, IGFBP, EIF3G et ADAM9.

Cette étude est menée dans le but de créer de nouvelles perspectives dans la thérapie de la CBP en utilisant les micro-ARN protecteurs pour le traitement de la maladie en premier temps, et en second temps de valoriser ces résultats pour crée un test PCR multiplex comme un test de pronostic et de diagnostic pour cette pathologie.

Mots clés : Cirrhose biliaire primitive, NASH, miR-122, miR-15A, miR-30e, miR-192 miR-99A, miR-LET7BHG, miR-LET7

Abstract:

Primary biliary cirrhosis is an autoimmune disease that affects small intra-hepatic bile ducts. CBP promotes destruction of bile epithelial cells, and is characterized by the presence of mitochondrial autoantibodies (AMA), as well as anti-nuclear antibodies (FAN). The objective of the present study is to identify the genes of the micro-RNAs expressed differentially, to identify the biological role of their target genes and the interaction between them. For there 3 groups of individuals were selected: fifteen (15) patients with primary biliary cirrhosis (PBC), seven (7) patients with non-alcoholic stéatohépatitis (NASH) and six (6) healthy controls.

Nine (9) micro-RNAs expressed differentially : miR-122, miR-15A, miR-30e, miR-192 miR-99A, miR-LET7BHG,miR-LET7, miR-LET7 C and miR503. Among these genes, 6 microRNAs were found under-expressed and 3 microRNAs over-expressed in CBP patients. Which makes us say that the 5 first have a protective role and the 2 latters have an offensive role.

Furthermore, 7 PBC candidate genes targeted by micro-RNAs were detected, namely: ADAM10, IGF1R, CCNG1, ADAM17, IGF1R, EIF3G and ADAM9. This study is conducted with the aim of creating new perspectives in PBC therapy using protectives micro-RNA for the treatment of the disease first and second to value these results to create a multiplex PCR test as a prognosis and diagnostic test.

Keys words :Primary biliary cirrosis, NASH, miR-122, miR-15A, miR-30e, miR-192 miR-99A, miR-LET7BHG, miR-LET7.

المخلص :

التشمع الصفراوي الأولي (CBP) هو مرض مناعي ذاتي يصيب القنوات الصفراوية الصغيرة داخل الكبد. يؤدي المرض الى تدمير الخلايا الظهارية الصفراوية. يتميز بوجود احسام ذاتية مضادة للميتوكوندريا (AMA) و كذلك احسام ذاتية مضادة للنواة (ANA) .

هدفنا في هذه الدراسة هو تحديد جينات micro-ARN المعبر عنها بطرق مختلفة، و لتحديد الدور البيولوجي للجينات المستهدفة والتفاعل بينها.

لهذا الغرض ، تم اختيار 3مجموعات من الأفراد : 15 مريض مصابين بـ CBP و 7 مرضى يعانون من NASH و 6 عناصر صحية.

تمكنا من تحديد 9 micro-ARN معبر عنها بطرق مختلفة كنتيجة: miR-122 ,miR-15A,miR-30 E,miR-192, miR-LET7, miR-99A ,miR-LET7BHG miR-503 من بين هذه الجينات ، تم العثور على 6 microRNA تحت المعبر عنها وتم العثور على 3 microRNA فوق المعبر عنها في مرضى PBC. مما يجعلنا نقول إن للست الاوائل دور وقائي بينما للثلاث الاخرين دور هجومي.

علاوة على ذلك ، تم اكتشاف 7 جينات مرشحة للمرض مستهدفة بواسطة micro-RNAs وهي : ADAM10 , IGF1R و CCNG1, ADAM17, IGFBP, EIF3G ADAM9.

يتم إجراء هذه الدراسة بهدف خلق آفاق جديدة في العلاج باستخدام microRNA الوقائية لعلاج المرض في الخطوة الأولى وثانياً لتقييم هذه النتائج لإنشاء اختبار PCR متعدد الإرسال لتشخيص هذا المرض.

الكلمات الرئيسية : التشمع الصفراوي الأولي
miR99A, miR-LET7BHG, miR-LET7
NASH, miR-122, miR-15A, miR-30e, miR-192

Liste des figures

<u>Figures</u>	<u>Figures</u>	<u>Pages</u>
Figure 1	Anatomie du foie, voies biliaires et pancréas.	2
Figure 2	Localisation des différentes hépatites auto-immunes.	4
Figure 3	Représentation schématique de l'activation des cellules T CD4 par les CPA.	6
Figure 4	Mécanismes de blessure des BEC au cours de la CBP.	7
Figure 5	Biosynthèse des miARN chez l'animal. Les miARN sont obtenus dans le noyau par transcription ou par épissage à partir d'un intron.	10
Figure 6	Biosynthèse des miARN chez l'animal. Les miARN sont obtenus dans le noyau par transcription ou par épissage à partir d'un intron.	11
Figure 7	Représentation de l'outil NCBI GEO et son mode d'utilisation.	13
Figure 8	Représentation de l'outil Target Scan et son mode d'utilisation.	14
Figure 9	Représentation de l'outil TCGAportal et son mode d'utilisation.	15
Figure 10	Représentation vennDiagram du chevauchement dans les gènes significatifs entre les trois groupes d'étude.	16
Figure 11	Représentation vennDiagram du chevauchement dans les gènes significatifs entre les trois groupes d'étude.	17
Figure 12	Représentation volcanoplot des gènes exprimés de manière différentielle chez les groupes d'étude « CBP vs NASH ».	18
Figure 13	Représentation volcanoplot des gènes exprimés de manière différentielle chez les groupes d'étude « NASH vs HEALTHY ».	18
Figure 14	Représentation par histogramme du taux d'expression de miR122 chez les groupes d'étude (CBP, NASH, témoins sains).	20

Liste des figures

Figure 15	Représentation par histogramme du taux d'expression du gène IGFBP chez les groupes d'étude (CBP, NASH, témoins sains).	21
Figure 16	Représentation schématique du double rôle de miR122.	22
Figure 17	Représentation par histogramme du taux d'expression de miR30E chez les groupes d'étude (CBP, NASH, témoins sains).	22
Figure 18	Représentation par histogramme du taux d'expression du gène EIF3G chez les groupes d'étude (CBP, NASH, témoins sains).	23
Figure 19	Représentation schématique du double rôle de miR-30 E.	24
Figure 20	Représentation graphique du taux d'expression de miR192 chez les 3 groupes étudiés (CBP, NASH, témoins sains).	25
Figure 21	Représentation graphique du taux d'expression de miR-LET7C chez les 3 groupes étudiés (CBP, NASH, témoins sains).	26
Figure 22	Représentation schématique illustrant le rôle possible de miR-LET7C dans l'atteinte hépatique	27
Figure 23	Représentation du gène ADAM9. a) modèle d'homologie (Q13443/6bDZc) dont le pourcentage d'identité est: 28.6%. b) Modèle d'homologie (Q13443/2eroA) dont le pourcentage d'identité est: 39.4%.	Annexes
Figure 24	Représentation du gène GDF11 : a) modèle Homologue (O95390/5ntuA) dont le pourcentage d'identité est : 66.6%. b) PDB structure (5jhw) dont le pourcentage d'identité est :100%.	Annexes
Figure 25	Représentation de la structure en épingle à cheveux de la séquence du miR-15A.	Annexes

Liste des figures

Figure 26	Structure en épingle à cheveux de la séquence du miR30E.	Annexes
Figure 27	Représentation par histogramme de miR99A chez les 3 groupes étudiés (CBP,NASH, témoins sains).	Annexes
Figure 28	Représentation de la structure en épingle à cheveux de la séquence du miR-15A.	Annexes
Figure 29	Représentation de la structure en épingle à cheveux de la séquence du miR-99A.	Annexes
Figure 30	Représentation de la structure en épingle en à cheveux de la séquence du miR-503.	Annexes
Figure 31	Structure en épingle en à cheveux de la séquence du miR-192.	Annexes
Figure 32	Structure en épingle en à cheveux de la séquence du miR-LET7C	Annexes
Figure 33	Représentation par histogramme de miR-503 chez les 3 groupes étudiés (CBP,NASH, témoins sains).	Annexes
Figure 34	Représentation par histogramme de miR99A chez les 3 groupes étudiés (CBP,NASH, témoins sains).	Annexes
Figure 35	Représentation par histogramme de miR-LET7G chez les 3 groupes étudiés (CBP,NASH, témoins sains).	Annexes

Liste des tableaux :

<u>Tableaux</u>	<u>Tableaux</u>	<u>Pages</u>
Tableau I	Les haplo types HLA associés à la CBP et les effets des variations HLA protecteurs.	5
Tableau II	Critères de diagnostic et caractéristiques cliniques de la CBP.	8
Tableau III	Résultats des miRNA retrouvés par l'analyse NCBI GEO2R.	19
Tableau IV	Description des miR99a, miR15a, miRLET7G et le miR503.	28

Liste des abréviations :

AID : Activation-induced cytidine deaminase.

ALP : Les phosphatases alcalines.

AMA : Anticorps anti mitochondriale.

ANA : Anticorps anti nucléaire.

BEC : Cellules épithéliales biliaires.

CBP : Cirrhose biliaire primitive.

CD80 : Cluster de différenciation 80.

CMH : Complexe Majeur d'Histocompatibilité.

CPA : Cellule Présentatrice d'Antigène.

HLA : Human Leucocytes Antigène

IL : Interleukine

INF gamma : Interféron Gamma

miR : micro-ARN

IZKF3 : Zinc Finger Protein Ailos

NK : Natural Killer

PDC : Complexe Pyruvate Déshydrogénase

ROS : Reactive Oxygen Spices

TGF- β : Transforming growth factor beta

Th17 : Cellule T Helper

TLR : Les récepteurs Toll-like

TNF α : Facteur de nécrose tumorale

TYK2 : Tyrosine kinase

Glossaire

- **Cholangite sclérosante** : C'est une affection de cause inconnue, caractérisée par de multiples zones de fibrose localisée prédominant sur les canaux gros et moyens des voies biliaires. (**Valla, 2006**)
- **Cholestase** : Ensemble des manifestations liées à la diminution ou à l'arrêt de la sécrétion de la bile. (**Hamburger, 1982**)
- **La stéatose hépatique non alcoolique** : (aussi appelée stéato-hépatite métabolique ou **NASH**, « Non Alcoholic Steato Hepatitis ») maladie du foie gras. Cette maladie chez environ 1/3 des patients, évolue à travers différents degrés de fibrose vers une cirrhose et favorise l'apparition d'un carcinome hépato-cellulaire. (**Teresa Maria Antonini, 2016**)
- **La fibrose** : Tissu fibreux se développant là où les cellules hépatiques ont été détruites. Quand la fibrose s'étend, elle peut provoquer le développement d'une cirrhose. (**Housset G., 1999**)
- **L'apoptose** : Apoptose ou mort cellulaire programmée. C'est un mécanisme cellulaire, normal, intrinsèquement programmé, par lequel des cellules s'autodétruisent en réponse à un signal interne. (**Synergie Lyon Cancer 2013**)
- **La sénescence** : Un processus physiologique qui entraîne une lente dégradation des fonctions de la cellule (notion spécifique de sénescence cellulaire) à l'origine du vieillissement des organismes. (**Joel Aghion., 2003**)
- **Les cholangiocytes** : Ce sont les cellules qui tapissent les voies biliaires. Ils sont responsables d'importantes modifications de la bile sécrétée par les hépatocytes (cellules du foie). (**N Dianat et coll et al., 2014**)
- **La pyruvate déshydrogénase** : est un complexe multienzymatique d'un poids moléculaire de 10 millions, accroché à la face interne de la membrane interne de la mitochondrie. (**Ciszak et al., 2002**)
- **Mésenchyme** : Tissu conjonctif embryonnaire (mésoderme) qui donne le tissu conjonctif adulte, les cartilages, les os, les muscles. (**Edition Le Robert**)

Remerciements
Dédicaces
Liste des figures
Liste des tableaux
Abréviations
Glossaire
Résumé
Introduction.....1

Chapitre I : Partie bibliographique

I-Généralité.....2
I-1 la cirrhose2
I-2 La cirrhose biliaire primitive.....3
I-2-1 Epidémiologie de la CBP.....4
I-2-2 Les facteurs génétiques4
 a) Les polymorphismes HLA associés à la CBP.....4
 b) Les gènes candidats non HLA.....5
I-2-3 Physiopathologie de la CBP6
I-2-4 Diagnostic de la CBP.....7
 a) Tests biochimiques.....8
 b) Test immunologique (les autoanticorps).....8
 c) Les Immunoglobulines.....8
I-2-5 Epigénétique de la CBP.....9
 a) La méthylation.....9
 b) Les micro RNA9

Chapitre II : Matériel et méthodes

II-1 Recherche des gènes exprimés de manière différentielle12
II-1-1 NCBI GEO2R12
II-1-2- TCGA portal13
II-1-3 Target Scan Human (release 7.2)14

Table des matières

Chapitre III : Résultats et discussions

III Résultats et discussions.....15

Les références bibliographiques

Les annexes

Introduction

Introduction

Le foie est un organe central qui assure des fonctions essentielles à l'équilibre vital de l'organisme, tel que la synthèse, la dégradation et l'excrétion. **(Jakson et al., 1995)**. Cet organe noble est sujet à plusieurs maladies telles que la cirrhose biliaire primitive CBP, qui est une maladie auto-immune caractérisée par la destruction progressive des canaux biliaires intra-hépatiques et la présence d'autoanticorps en particulier l'anticorps anti-mitochondrie type 2 (AMA M2) (dans plus de 95 % des cas). **(Chantran et al., 2014)**.

La pathogenèse de la CBP est caractérisée par un processus auto immun affectant les cellules biliaires épithéliales (BEC). Plusieurs mécanismes sont suggérés dans la destruction de ces BEC, dont le mécanisme d'apoptose régulée par les micro-ARN. **(Marzorati et al., 2016)**.

La CBP en Algérie est une maladie à prédominance féminine ; d'après une étude faite par **Seninet et al., (2015)** à l'hôpital central de l'armée. Cette étude a été réalisé sur un groupe de 105 patients dont 77 femmes (73%) et 28 hommes (17%) atteints d'hépatopathologies auto-immunes.

La cholangite sclérosante primitive (CSP) est une maladie caractérisée par une atteinte inflammatoire idiopathique et fibrosante des voies biliaires intra et/ou extrahépatiques. L'évolution de cette affection cholestatique chronique est variable mais peut se faire vers la cirrhose et les complications graves des hépatopathies. De nombreux aspects de cette maladie restent inconnus ou imprécis. **(Molodecky et al., 2011)**

Grâce aux nouvelles technologies telles que le séquençage à haut débit NGS, plusieurs micro-ARN exprimés de manière différentielle ont été mis en évidence chez les patients atteints de CBP. Parmi ces micro-ARN nous retrouvons le miR-30E qui a un rôle protecteur en réprimant le gène cible EIF3G impliqué dans le processus de l'apoptose. **(Marzorati et al., 2016)**.

Dans cette étude, nous nous sommes penchés sur l'implication des micro-ARN dans la physiopathologie de la CBP. En utilisant l'outil bio-informatique, nous avons tenté d'identifier les micro-ARN ayant une expression variable chez les 3 groupes de patients étudiés (CBP, NASH et témoins sains), identifier leurs cibles géniques, présumer le rôle biologique de ces gènes cibles dans la physiopathologie de la CBP. Cette étude a pour intérêt de chercher de nouvelles perspectives dans la thérapie de la pathologie.

Chapitre I : Rappel bibliographique

I. Généralités

Le foie est un organe vital impliqué dans de nombreux processus métaboliques tels que la formation de la bile. (David Q-H *et al.*,2016). La bile est collectée par les voies biliaires et menée à la sortie du foie dans le canal cholédoque qui débouche dans le duodénum où la bile est utilisée pour la digestion. Une partie de la bile est stockée dans la vésicule biliaire, elle est reliée au cholédoque par le canal cystique(Figure1) (Oriana et Denis., 2015). L'épithélium biliaire est un système interconnecté complexe de conduits tubulaires, bordés de cellules biliaires épithéliales (cholangiocytes) qui forment les plus belles branches de l'arbre biliaire (Lleo *et al.*,2020).

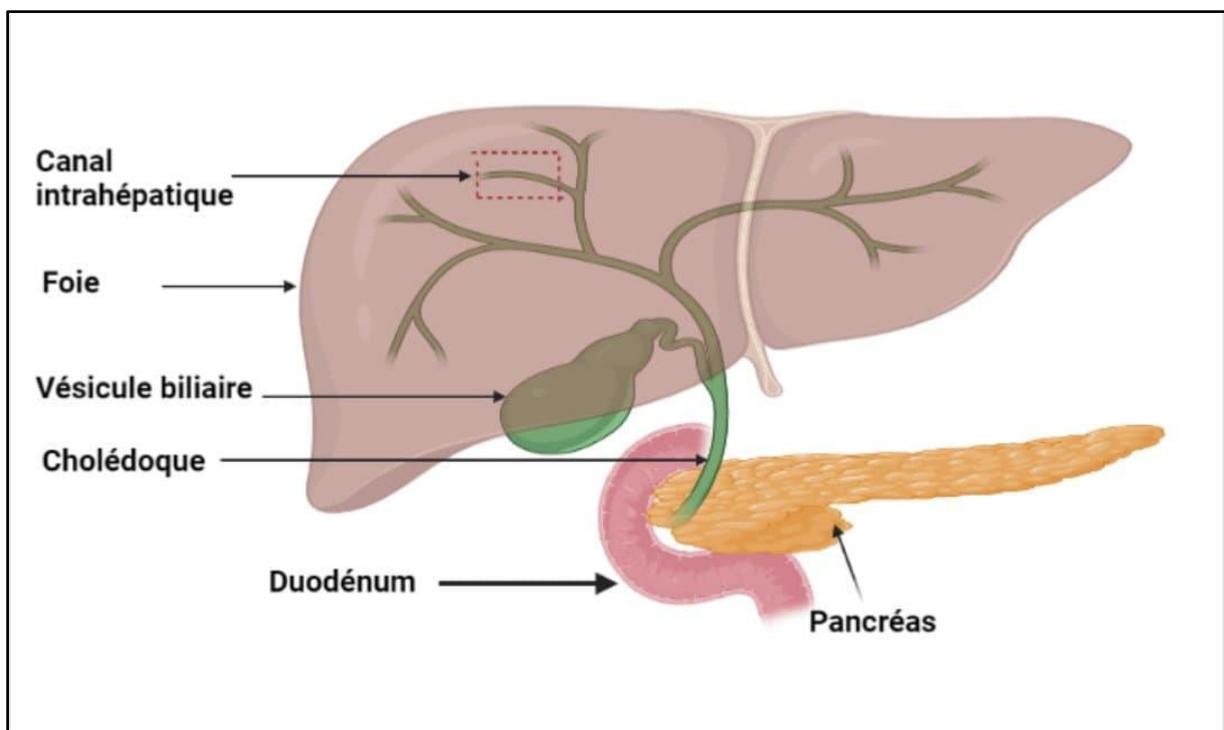


Figure 1 : Anatomie du foie, voies biliaires et pancréas (Seninet *et al.*, 2021 Unpublished data)

I-1 La cirrhose

Par définition, la cirrhose est un processus diffus caractérisé par la fibrose et la conversion de l'architecture hépatique normale en nodules structurellement anormaux. Les caractéristiques clés sont la formation de nodules régénératifs d'hépatocytes entourés de septums fibreux, et de troubles vasculaires qui intègrent souvent à la fois les veines centrales et les voies portales. (John et Margaret, 2016)

I-2 La cirrhose biliaire primitive

La cirrhose biliaire primaire (anciennement appelée cholangite biliaire primaire) est une maladie hépatique auto-immune caractérisée par un cycle de lésions des cellules épithéliales biliaires, de cholestase et de fibrose progressive qui peut évoluer avec le temps vers une cirrhose biliaire au stade terminal (**Gideon et al., 2018**).

La CBP est considérée comme une maladie auto-immune prototypique car elle résulte d'une réponse immunologique contre un auto antigène mitochondrial (PDC-E2), et se caractérise par la présence des AMA ainsi que les cellules T CD4 et CD8 auto réactives (**Lleo et al., 2020**).

La CBP est plus répandue chez les femmes âgées de plus de 50 ans que chez les hommes (**Gideon et al., 2018**). La raison de cette différence est mal connue, mais une étude a révélé que la monosomie du chromosome X était plus fréquente chez les femmes atteintes de la CBP, cela suggère que les gènes de l'immunodéficience sont liés au chromosome X ce qui mène à la production de niveau élevés d'IgM et à la formation de granulome. (**Treta et Mitchell., 2015**). Les anticorps antimitochondriaux (AMA) très spécifiques sont détectables et activent les réponses immunitaires innées. (**Kazuhito et al., 2012**).

La CBP évolue du point de vue histologique en 4 stades :

- 1- Lésion des canaux et inflammation portale.
- 2- Augmentation des lésions péri portales avec une hépatite d'interface.
- 3- Altération de l'architecture hépatique due à la présence de plusieurs fibroussepta.
- 4- Stade de la cirrhose. (**Treta et Mitchell, 2015**)

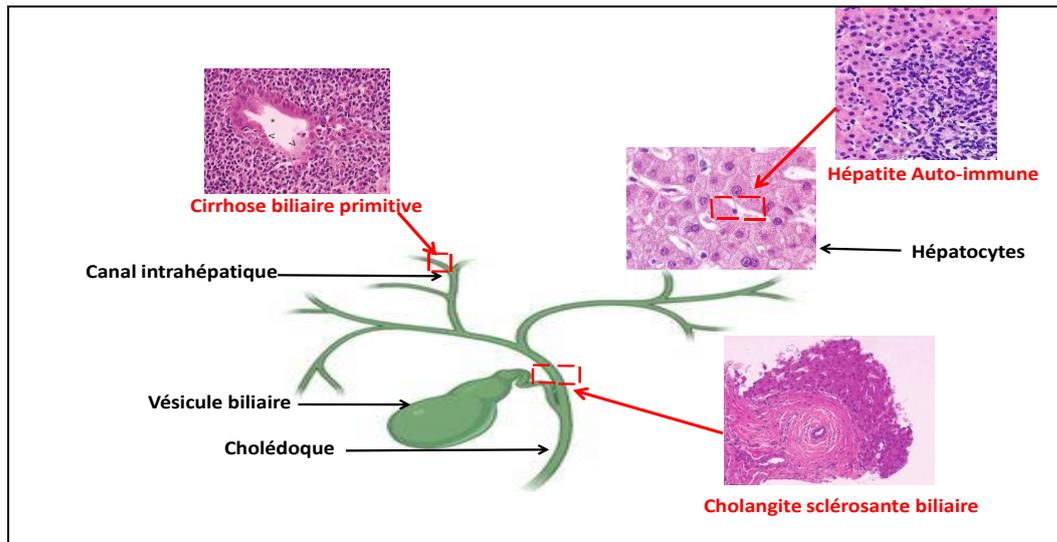


Figure 2 :Localisation des différentes hépatites auto-immunes

(Seninet *et al.*, 2021 Unpublished data)

I-2-1 Epidémiologie de la CBP

La prévalence de la CBP est de 400/million d’habitants aux USA, 200-250/million d’habitants en Europe du nord et de 20/million d’habitants en Afrique et en Asie. Cette différence significative dans les chiffres révèle du manque d’études épidémiologiques en Afrique et en Asie relativement aux USA et à l’Europe du nord.

Les facteurs génétiques et environnementaux tels que l’exposition au soleil, aux produits chimiques, aux toxines, aux bactéries, aux virus et la consommation du tabac peuvent jouer un rôle dans la pathogenèse de la CBP (Treta et Mitchell, 2015)

I-2-2 Les facteurs de prédisposition génétiques

a- Les polymorphismes HLA associés à la CBP

Les polymorphismes du locus HLA sur le chromosome six sont associés à la CBP. Les haplo-types HLA-DRB1*08 et B1*02 ont été montrés comme facteurs de risque associés à la CBP, alors que les haplo types HLA-DRB1*11 et HLA-DRB1*13 ont été montrés comme protecteurs contre la CBP (TableauI) (Webb *et al.*,2015)

Tableau I : Les haplotypes HLA associés à la CBP et les effets des variations HLA protecteurs. (**Webb et al., 2015**)

Risque associé
HLA-DQA1*04:01- HLA-DQB1*04:02- HLA-DRB1*08:01- HLA-B*39:05
HLA-DRB1*04:04-HLA-DQB1*03:02
HLA-DRB1*14-HLA-DPB1*03:01
HLA-DRB1*08:03-HLA-DQB1*06:01
HLA-DRB1*04:05-HLA-DQB1*04:01
Effet protecteur
HLA-DQB1*06:02-HLA-DRB1*15:01-HLA-DQA1*01:02-HLA-B*07:02
HLA-DQB1*03:01-HLA-DRB1*11:01-HLA-DQA1*05:01-HLA-DRB1*11:04
HLA-DRB1*13:02- HLA-DQB1*06:04

b- Les gènes candidats non HLA

➤ ***IL12A* et *IL12B***

L'IL12 est composé de 2 sous unités p35 et p40 codés par les deux gènes *IL12A* et *IL12B* respectivement, les deux sous unités s'hétérodimerisent avec IL23RB1 pour former l'IL23 impliqué dans la voie de signalisation de Th17. Les deux récepteurs à l'IL12 sont : IL12RB1 qui est exprimé de manière consécutive et IL12RB2 qui est stimulé par INF γ pour la boucle de rétroaction pour la stimulation antigénique. La TYK2 est impliquée dans l'activation de la signalisation de ces deux voies. Les variations au niveau de ces gènes sont associées à la CBP.

- **CD80 ou (B7)** : molécule de co-stimulation impliquée dans la présentation antigénique CPA-TCD4.

- **IL17R** : Les mutations au niveau de ce gène diminuent la différenciation des cellules T aux différentes populations cela mène à une dérégulation immunitaire et à l'auto-immunité.
- **IZKF3** : ce gène code pour un facteur de transcription impliqué dans la prolifération des cellules B. L'IZKF3 a aussi un lien dans le développement de Th17.
- **SH2B3** : ce gène code pour protéine adaptatrice SH2B3 ou Lnk impliquée dans plusieurs voies de signalisations des cytokines et de facteurs de croissances. Les souris déficientes en SH2B3 présentent un niveau élevé de cellules T activées et ont une grande tendance à développer des maladies auto-immunes. (Webb *et al.*,2015)

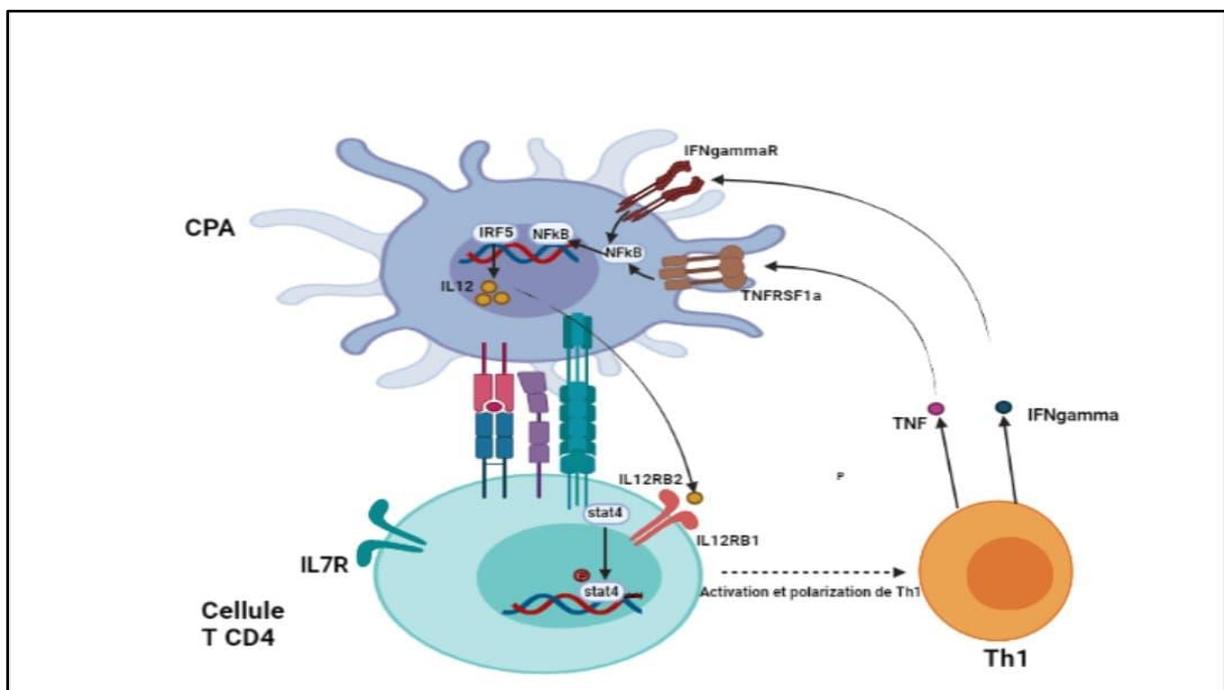


Figure 3 : Représentation schématique de l'activation des cellules T CD4 par les CPA.

(Seninet *et al.*, 2019 Unpublished data)

I -2-3 Physiopathologie de la CBP

La pathogenèse de la CBP est caractérisée par un processus auto immunitaire affectant les BEC, la réponse immunitaire déclenchée aussi bien par les cellules T que pas les cellules B est dirigée contre des auto antigènes spécifique PDC (complexe pyruvate déshydrogénase) provoquant ainsi une destruction progressive des voies biliaires.

Cette destruction peut se produire par l'un des 3 mécanismes suggérés qui peuvent être indépendants les uns des autres(**Figure4**) :

- a. Une blessure auto-immune via les actions de cellules T cytotoxiques réactives avec des épitopes PDC. Un mécanisme potentiel alternatif est par cytotoxicité cellulaire dépendante de la réactivité des anticorps contre les protéines PDC exprimées à la surface des BEC dans la CBP par médiation des cellules NK.
 - b. Les effets toxiques des acides biliaires hydrophobes capables d'induire l'apoptose des BEC en raison de la perte du « parapluie bicarbonate »de protection.
 - c. La plasticité des BEC résultant des actions locales de TGF- β converti à partir de la forme latente en active déclenché par le stress oxydatif résultant des actions de ROS.
- (Jessica *et al.*, 2015)

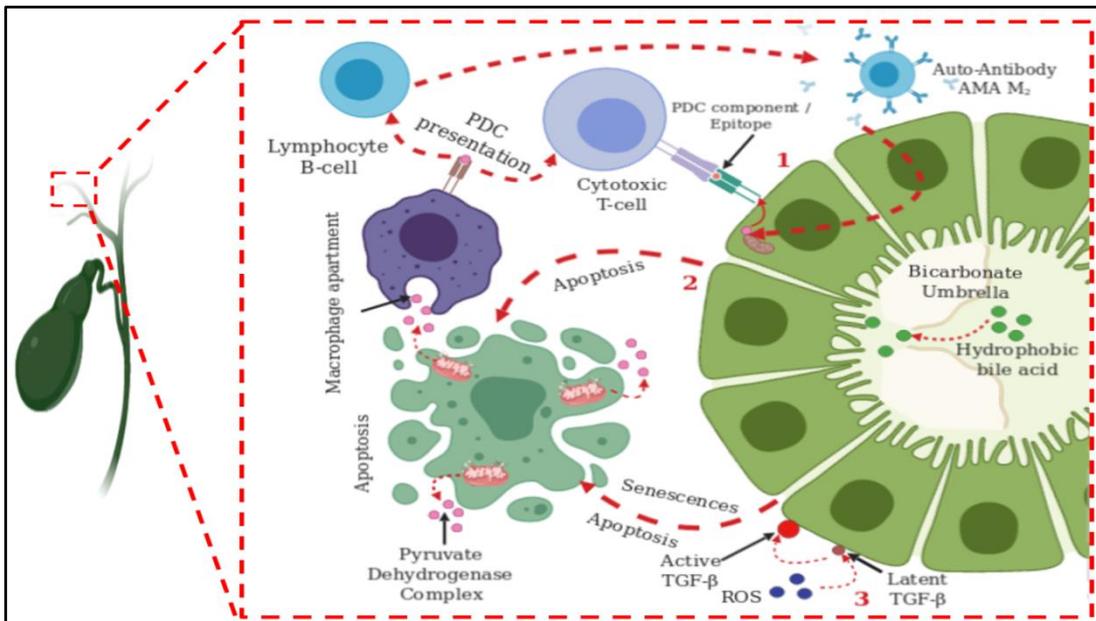


Figure4 :Mécanismes de blessure des BEC au cours de la CBP.

(Unpublished data, Seninet *et al.*, 2019)

Les BEC expriment les TLR et peptides antimicrobiens ; agissant comme des CPA en exprimant des molécules de CMH recrutant ainsi les leucocytes au site cible en exprimant des molécules d'adhésion, cytokines et chimiokines. Les BEC sont caractérisées par la diminution des marqueurs biliaires et épithéliaux, l'acquisition des marqueurs pro-inflammatoire, pro-fibrotique et mésenchymateux et une dérégulation de l'autophagie suivie par une sénescence et enfin la necroptose. (Lleo *et al.*, 2020)

I -2-4 Diagnostic de la CBP

a- Tests biochimiques

La CBP devrait être suspectée lorsqu'il y a une élévation de la phosphate alcaline sérique (ALP) inexplicée (1.5 fois la valeur normale), des élévations d'aminotransférases et des IgM. Le diagnostic de la CBP peut être établi si deux des trois critères sont présents : 1) signes biochimiques de cholestase (activité sérique des ALP) 2) présence d'AMA. 3) lésion de cholangite destructrice non suppurée des canaux biliaires interlobulaires (**Tableau II**) (**Christopher L et Eric Gershwin., 2014**).

Tableau II : Critères de diagnostic et caractéristiques cliniques de la CBP. (**Christopher L et Eric Gershwin, 2014**)

Deux parmi ces trois critères :
Phosphate alcaline >1.5 fois ULN.
Présence d'AMA.
Lésion de cholangite destructrice non suppurée des canaux biliaires interlobulaires.
Autres caractéristiques :
Présence d'ANA (Sp100 et gp210).
Présence d'IgM élevée.
Hypercholestérolémie/Xanthomas.
Prurits.
Fatigue.

b- Tests immunologiques

La PBC est caractérisée sérologiquement par des autoanticorps spécifiques pour les antigènes mitochondriaux, nucléaires. AMA de type M2 (anti corps anti mitochondriale) plus précisément anti composant E2 de l'enzyme PDH et ANA (anti corps anti nucléaires) anti protéines de la membrane nucléaire gp120 et sp100. (**Gideon et al., 2018**). Les AMA sont les marqueurs les plus spécifiques, ils sont détectés chez > de 90% des patients atteints de la CBP. L'anticorps fait partie d'une famille d'enzymes : Complexe Pyruvate Déshydrogénase (PDC), Complexe de la 2-Oxo-Glutarate Déshydrogénase (COGD) et Complexe de la Oxo-Acide Déshydrogénase (COADG). Ces enzymes catalysent la décarboxylation oxydative du substrat cétoacide et sont situés sur la membrane interne de la mitochondrie. Dans certains cas le patient est AMA négatifs, les ANA doivent être déterminés dans ce cas y compris les

protéines (p120 et sp100). Les AMA sont détectés dans les laboratoires cliniques par dosage immunoenzymatique. (Treta et Mitchell., 2015)

c- Dosage des Immunoglobulines

Des modifications des concentrations des IgG et des IgM sont observées chez les patients atteints de la CBP. Avec une concentration moyenne d'IgM de 2.4x plus que la normale et une concentration d'IgG de 1.16 x plus que la normale.(Gideon *et al.*, 2018)

I -2-5 Epigénétique de la CBP

a- La méthylation

Une analyse approfondie de la méthylation du chromosome X dans les cellules CD4+ et CD8+ a démontré :

- Une hyperméthylation du gène FUNDC2 (code pour une protéine responsable d'autophagie mitochondriale) dans les cellules T CD8.
- Une déméthylation du CXCR3 (code pour un récepteur aux cytokines) dans les cellules T CD4 chez les patients atteints de CBP.

La majorité des gènes méthylés sont localisés sur le chromosome X des patients atteints de CBP cela explique la prédominance féminine. Cette hyperméthylation est observée sur des gènes de régulation de la réponse immunitaire telle que le gène IFT11. (Marzorati *et al.*,2016)

b- Les micro RNA

Les microARN (miARN) sont de courts ARN non codants (20-24 nt) qui sont impliqués dans la régulation post-transcriptionnelle de l'expression des gènes dans les organismes multicellulaires en affectant à la fois la stabilité et la traduction des ARNm(**Figure 5**).

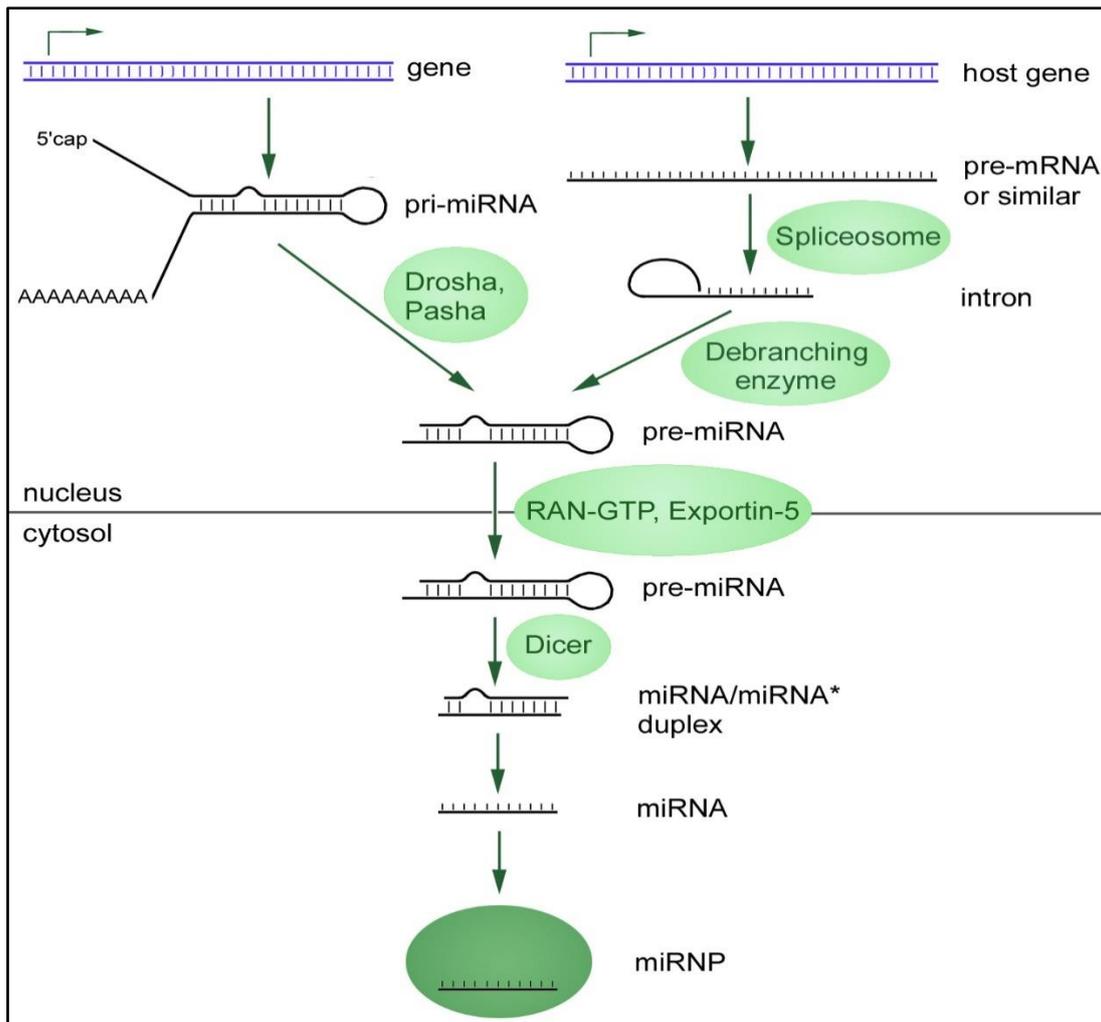


Figure 5 :Biosynthèse des miARN chez l'animal (Okamura K *et al.*,2008).

Les miARN sont obtenus dans le noyau par transcription ou par épissage à partir d'un intron. Ils sont transcrits par l'ARN polymérase II dans le cadre de transcriptions primaires plafonnées et polyadénylées (pri-miARN) qui peuvent être codantes ou non codantes. La transcription primaire est clivée par l'enzyme Drosha ribonucléase III pour produire un miARN précurseur de tige-boucle d'environ 70-nt (pré-miARN), qui est encore clivé par la ribonucléase cytoplasmique de Dicer pour générer les produits matures miRNA et antisensmiRNA star (miRNA*). Le miARN mature est incorporé dans un complexe de silencage induit par l'ARN (RISC), qui reconnaît les ARNm cibles grâce à un appariement de base imparfait avec le miARN et entraîne le plus souvent une inhibition transtraductionnelle ou une déstabilisation de l'ARNm cible(**Figure6**) ce qui régulent les principaux processus cellulaires tels que l'apoptose, la différenciation, le cycle cellulaire et les fonctions immunitaires.

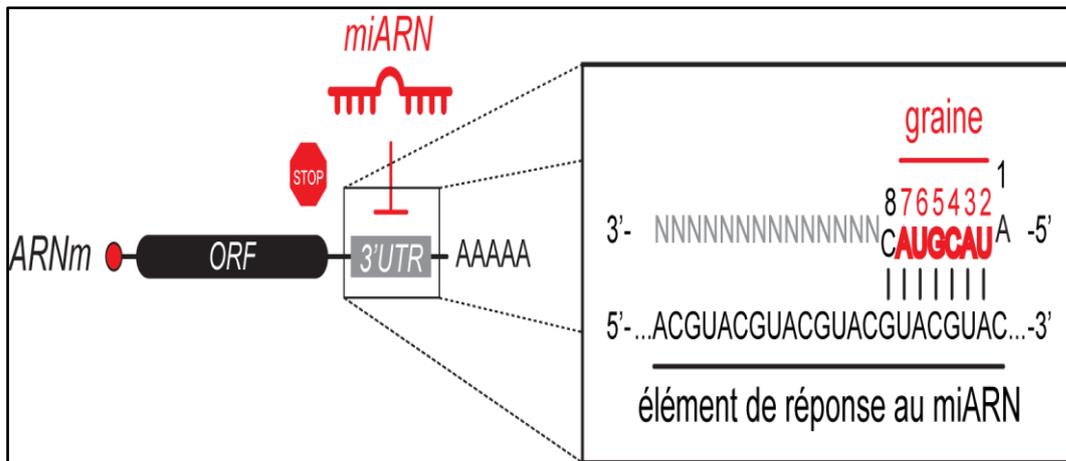


Figure 6 : Biosynthèse des miARN chez l'animal. Les miARN sont obtenus dans le noyau par transcription ou par épissage à partir d'un intron. (Khvorova *et al.*, 2003)

Grâce aux technologies avancées, plus de 200 miR exprimés de manière différentielle chez les patients atteints de CBP. (Marzorati *et al.*, 2016).

L'analyse de l'expression des microRNA et des ARNm dans les cellules T CD4 de 14 patients CBP et de 10 témoins sains a démontrée 4 miR régulés à la baisse (miR-181a, miR-181b, miR 374, miR-425) chez les cellules T CD4 des patients atteints de CBP. La baisse du taux de miR 425 induit considérablement les cytokines inflammatoires (IL2 et IFN γ) par le biais de N-RAS qui est à la hausse dans la voie de signalisation du TCR. Le miR 425 a été démontré comme un régulateur inflammatoire de la CBP. Par conséquent la restauration de miR-425 ou l'inhibition du facteur de transcription N-RAS peuvent constituer une stratégie prometteuse dans la thérapie de la CBP. (Nakagawa *R et al.*, 2017).

Le miR-506 est régulé à la hausse dans la CBP et entraîne :

- Une diminution de l'activité de AE2 (enzyme d'échange d'anion Cl^- / HCO_3^- menant à la sécrétion de bicarbonate dans la bile).
- Une altération des fonctions de sécrétion biliaire.
- Un déséquilibre du PH intracellulaire.

Chapitre II :

Matériel & Méthodes

Il s'agit d'une étude d'expression génique transcriptomique, *InSilico*, des cellules épithéliales hépatiques au cours d'une cirrhose biliaire primitive. Divers outils bioinformatiques ont été utilisés (NCBI GEO2R, Limma R, Target Scan Human, Gene Clip 2.0, Agile Protein Interactome Dataserver).

II-1-Matériel biologique :

Cette étude est basée sur l'indentification du profil d'expression des gènes des micro-ARN au niveau du tissu hépatique chez :

- 15 patients (3 déclarés atteints de cirrhose biliaire primitive et 12 atteints de cholangite sclérosante primitive),
- 7 patients atteints de NASH (Stéatohépatite non alcoolique),
- 6 témoins sains.

L'ARN utilisé pour les expériences de puce à ADN a été extrait de tissus frais congelés obtenus à partir de foies explantés ou de biopsies hépatiques. Les échantillons du foie ont été fournis par la biobanque norvégienne pour la Cholangite sclérosante primitive, Oslo, Norvège. La puce Affymetrix Human Gene 1.0 st a été utilisée.

Les données de la puce à ADN (**GSE159676**) ont été téléchargées de la base de données Gene Expression Omnibus (<https://ncbi.xyz/geo/query/acc.cgi?acc=GSE159676>).

II-2- Les outils bio-informatiques :

Le paquet **Bioconducteur Limma R**, nous a permis d'identifier les gènes exprimés de manière différentielle (DEG) entre les échantillons CBP, NASH et témoins. Ensuite l'indentification des gènes ciblés par ces micro-ARN a été faite par l'outil **Target Scan Human** (http://www.targetscan.org/vert_72/), nous avons aussi utilisé **TCGApotal** (<http://www.tcgaportal.org/>) pour cibler l'expression des micro-ARN au niveau du tissu spécifique (le foie).

L'étude des interactions entre les micro-ARN et les gènes cibles a été réalisée par (Agile Protein Interactome Dataserver).

II-2-1 NCBI GEO2R

NCBI GEO2Rest un outil qui permet aux utilisateurs de comparer deux ou plusieurs groupes d'échantillons issus à partir de résultats brutes de puces à ADN, RNAseq, CHIPseq, afin d'identifier les gènes qui sont exprimés de manière différentielle. Les résultats sont présentés sous forme de tableau indiquant les paramètres suivants : le nom des gènes, l'identifiant, le P value, la localisation chromosomique du gène, le numéro d'accèsion du gène.

NCBI GEO2R utilise le paquet Limma R (Linear Models for Microarray Analysis) du projet « Bioconductor » qui est basé sur le langage de programmation R pour analyser les données des micros-puces d'expression génique, en particulier l'utilisation de modèles linéaires pour analyser les expériences conçues et l'évaluation de l'expression différentielle. Limma offre la possibilité d'analyser des comparaisons entre de nombreux ARN cible simultanément dans des expériences arbitraires complexes conçues.

Nous avons sélectionné les trois (3) groupes à étudier (patients atteints de CBP, patients atteints NASH, témoins sains « healthy ») avec les paramètres suivants : le nom des gènes, l'identifiant, le P value, la localisation chromosomique du gène, le numéro d'accèsion du gène. (**Figure 7**)



Figure 7 : Représentation de l'outil NCBI GEO et son mode d'utilisation.

II-2-2 Prédiction des cibles biologique par le Target Scan Human (release 7.2)

TargetScan(<http://www.targetscan.org/>) prédit les cibles biologiques des miARN en recherchant la présence de sites conservés 8mer, 7mer et 6mer qui correspondent à la région de graine de chaque miARN TargetScan prédit les cibles biologiques des miARN en

recherchant la présence de sites 8mer, 7mer et 6mer conservés qui correspondent à la région d'ensemencement de chaque miARN (**Figure 8**).

The image shows the TargetScan web interface. It features several input fields and dropdown menus. Three red arrows point to specific elements, each with a text box in French: 'Sélectionner l'espèce' points to the species dropdown (set to 'Human'), 'Entrer le nom du gène' points to the gene symbol input field (containing 'Hmga2'), and 'Entrer le nom du miR' points to the microRNA name input field (containing 'miR-9-5p'). The interface includes sections for selecting microRNA families and other annotations, along with 'Submit' and 'Reset' buttons. At the bottom, there is a detailed description of the TargetScan algorithm and its release information.

Figure 8 : Représentation de l'outil Target Scan et son mode d'utilisation.

II-2-3- TCGA portal

Le Cancer Genome Atlas (TCGA), un programme historique de génomique du cancer, a caractérisé au niveau moléculaire plus de 20 000 cancers primitifs et a apparié des échantillons normaux couvrant 33 types de cancer.

Cet effort conjoint entre le NCI et le National Human Genome Research Institute a débuté en 2006, réunissant des chercheurs de diverses disciplines et de multiples institutions.

Au cours des douze années suivantes, TCGA a généré plus de 2,5 petabytes de données génomiques, épigénomiques, transcriptomiques et protéomiques. Les données, qui ont déjà permis d'améliorer notre capacité à diagnostiquer, traiter et prévenir le cancer et pathologies génétiques, resteront accessibles au public pour que tous les membres de la communauté des chercheurs puissent les utiliser.

Nous avons utilisé l'outil TCGAportal (<http://www.tcgaportal.org/>) afin d'étudier l'expression de chaque gène au niveau du tissu hépatique. (**Figure 9**)

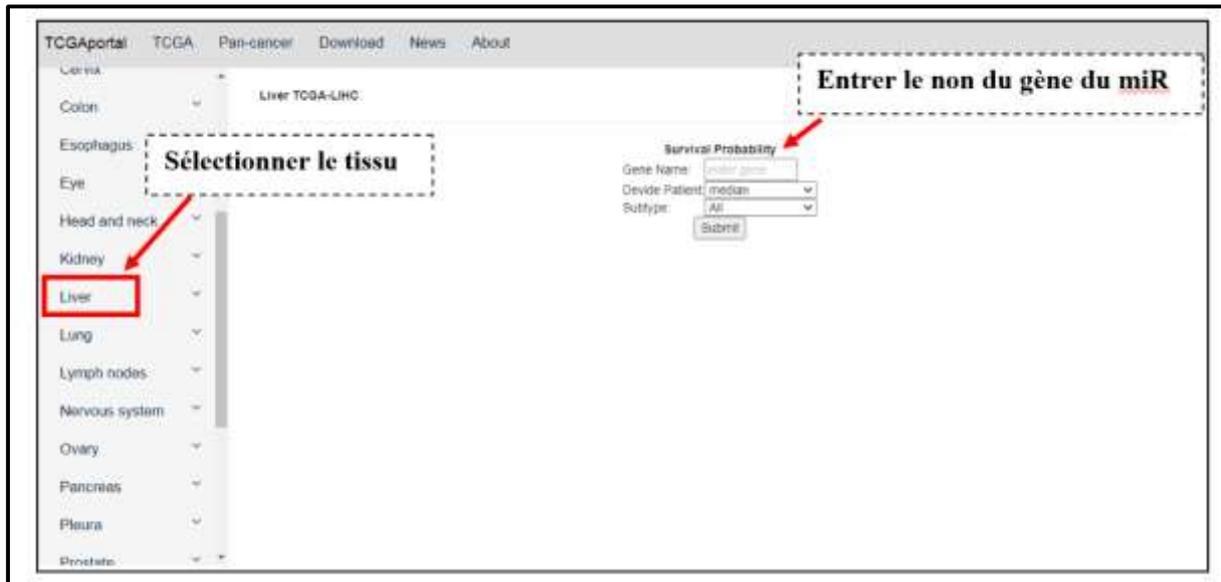


Figure 9: Représentation de l'outil TCGAportal et son mode d'utilisation.

Chapitre III: Résultats & Discussions

D'après les résultats obtenus de NCBI GEO nous avons retrouvé plus de 12090 gènes (**Figure10**), Généré à l'aide de Limma (vennDiagram). Nous avons pu explorer et télécharger le chevauchement dans les gènes significatifs entre les trois groupes d'étude.

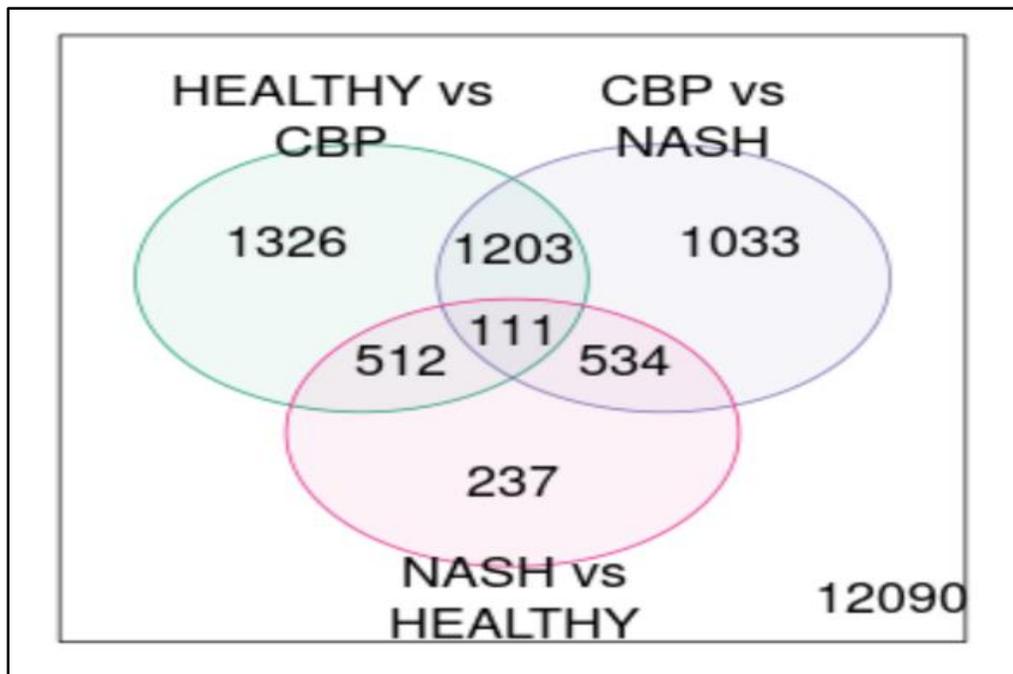


Figure10: Représentation vennDiagram du chevauchement dans les gènes significatifs entre les trois groupes d'étude.

Dans le diagramme de Venn illustré dans la **figure11**, on peut constater le nombre de gène exprimés de manière différentielle dans chaque groupe, ainsi que les chevauchements dans les gènes significatifs entre les trois groupes à savoir :

- « Contrôle sain vs CBP » : 1326 gènes,
- « Contrôle sain vs NASH » : 1033 gènes,
- « CBP vs NASH » : 237 gènes,
- « Contrôle sain vs CBP » vs « CBP vs NASH » : 512 gènes,
- « Contrôle sain vs CBP » vs « Contrôle sain vs NASH » : 1203 gènes,
- « Contrôle sain vs CBP » vs « CBP vs NASH » vs « Contrôle sain vs NASH » : 111 gènes,
- « CBP vs NASH » vs « Contrôle sain vs NASH » : 534 gènes.

Généré à l'aide delimma (volcanoplot) le diagramme volcan montre la signification statistique (valeur $-\log_{10} P$) par rapport à l'ampleur du changement (changement de pli \log_2) pour la visualisation des gènes exprimés de manière différentielle chez les groupes d'étude à savoir :

- « Contrôle sain vs CBP », (**Figure11**)
- « Contrôle sain vs NASH », (**Figure 13**)
- « CBP vs NASH ». (**Figure 12**)

Les gènes mis en évidence sont exprimés de manière significative différentielle à un seuil de valeur de p ajusté par défaut de 0,05 (rouge = upregulated, bleu = downregulated).

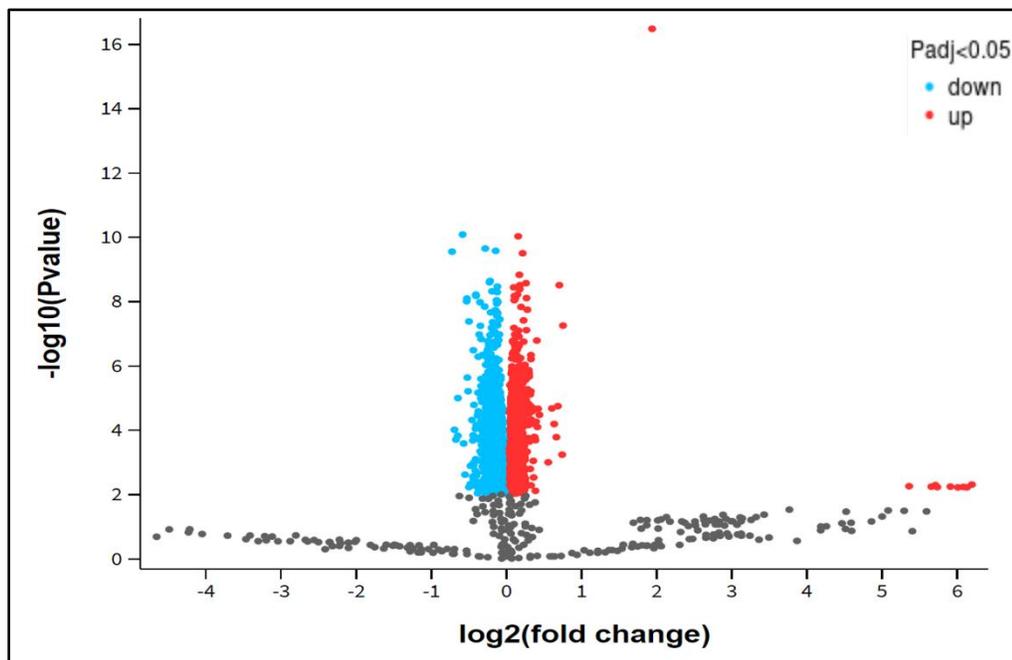


Figure11 : Représentation volcanoplot des gènes exprimés de manière différentielle chez les groupes d'étude « Healthyvs CBP ».

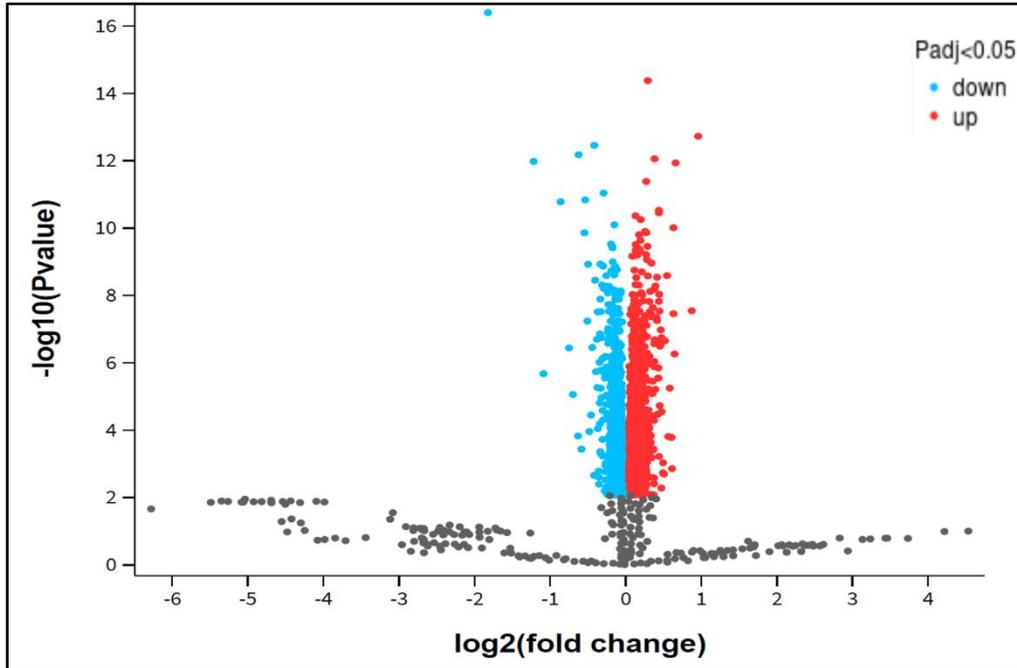


Figure 12 : Représentation volcanoplot des gènes exprimés de manière différentielle chez les groupes d'étude « CBP vs NASH ».

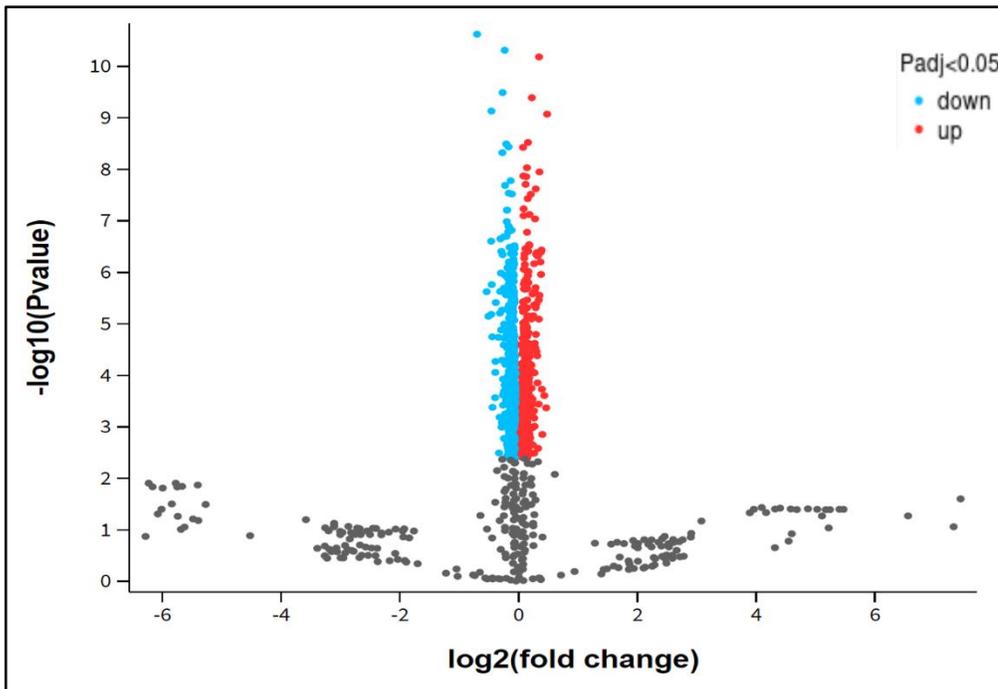


Figure 13: Représentation volcanoplot des gènes exprimés de manière différentielle chez les groupes d'étude « NASH vs HEALTHY ».

Parmi les 12090 gènes retrouvés dans ces résultats, neuf (09) micro-RNA sont exprimés de manière différentielle chez les différents groupes étudiés CBP, NASH et témoins sains (healthy) (*Tableau III*)

Tableau III: Résultats des miRNA retrouvés par l'analyse NCBI GEO2R.

N°	ID	P.val	Gene symbole	Chr localisation
1	8021416	3.97e-11	Mir122	18q21-1
2	7900488	6.12e-09	Mir30E	1p34-2
3	8067944	1.15e-07	Mir LET7C	21q211
4	8067942	3.42e-07	Mir99A	21q21-1
5	7949273	2.33e-06	Mir192	11q13-1
6	7971661	4.40e-06	Mir15A	13q14-2
7	8073816	6.73e-06	MirLET7BHG	22q13-31
8	8087881	3.11e-05	MirLET7G	3p21-1
9	8175261	4.13e-09	Mir503	Xq26.3

- **miR122** est sous-exprimé chez les patients atteints de CBP avec une différence significative $p < 0.05$, par rapport à son expression chez les patients atteints de NASH ainsi qu'aux témoins sains où le taux d'expression du miR 122 est retrouvé pratiquement le même sans différence significative $p > 0.05$. (**Figure14**)

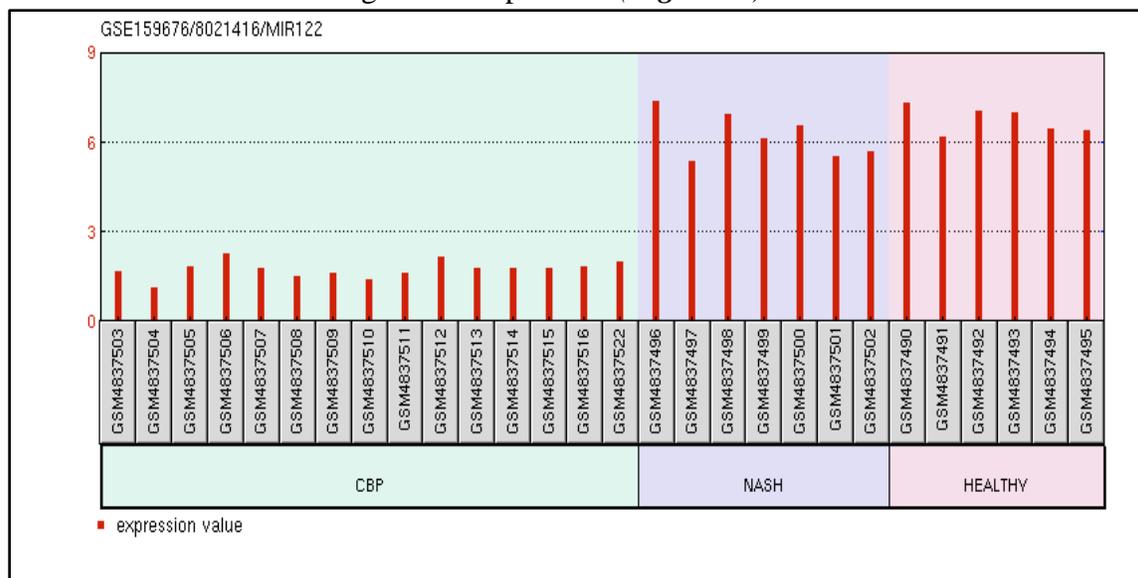


Figure 14: Représentation par histogramme du taux d'expression de miR122 chez les groupes d'étude (CBP, NASH, témoins sains).

Selon **Coulouarn, et al 2009**, les niveaux de miR-122 sont fréquemment réduits dans le carcinome hépatocellulaire (CHC) par rapport au foie normal, et les niveaux bas de miR-122 sont corrélés avec un mauvais pronostic.

La surexpression de miR-122 réduirait les propriétés tumorigènes dans les lignées cellulaires CHC, ce qui suggère qu'il fonctionne comme un gène suppresseur de tumeur, et augmente la réponse des cellules aux médicaments chimiothérapeutiques. Plusieurs gènes cibles miR-122 ont été impliqués dans la tumorigenèse, y compris ADAM10, IGF1R, CCNG1 et ADAM17. (**TsaiWet al., 2009**)

D'après les résultats retrouvés des gènes exprimés de manière différentielle (**Figure15**), le gène IGF1R (p -valu = $1.61e-12$) est surexprimé chez les patients atteints de CBP et les témoins par rapport au groupe de patients atteints de NASH, aucune différence significative n'a été retrouvée entre les trois groupes.

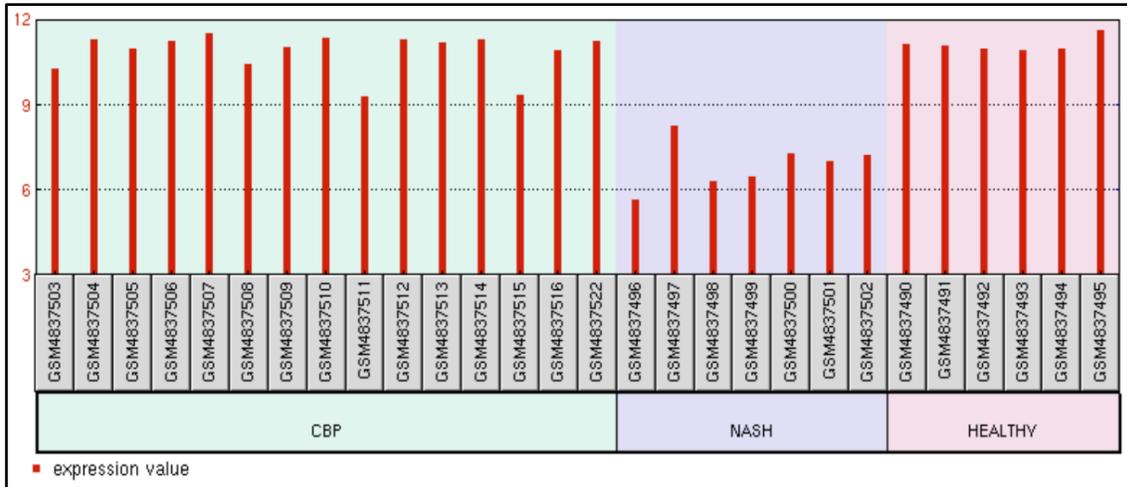


Figure 15 : Représentation par histogramme du taux d’expression du gène IGF1P chez les groupes d’étude (CBP, NASH, témoins sains).

Ces résultats des taux élevés du gène IGF1P chez le groupe de patients atteints de CBP corroborent avec les résultats de la sous-expression du miR122 chez ce groupe, d’où ça fonction de réprimer le gène IGF1P qui est un membre de la famille des protéines de liaison au facteur de croissance analogue à l’insuline, **Leu et George (2007)** ont conclu que l’IGF1P1 pourrait être un régulateur négatif de la voie p53/BAK-dépendante de l’apoptose. **(Figure16) (Leu J et al., 2007)**

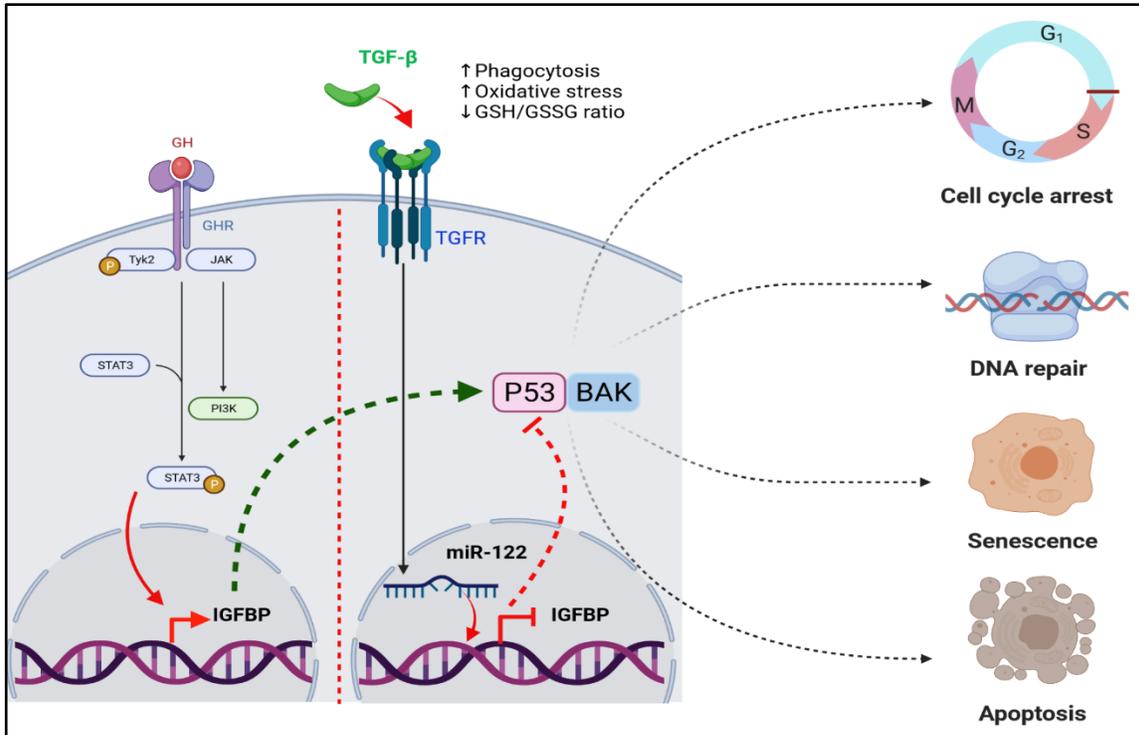


Figure16: Représentation schématique du double rôle de miR122. (Seninet et al., 2021 Unpublished data)

- **miR30E** est sous-exprimé chez les patients atteints de CBP avec une différence significative $p < 0.05$, par rapport à son expression chez les patients atteint de NASH ainsi qu’aux témoins sains où le taux d’expression du miR30E est retrouvé pratiquement le même sans différence significative $p > 0.05$. (Figure17)

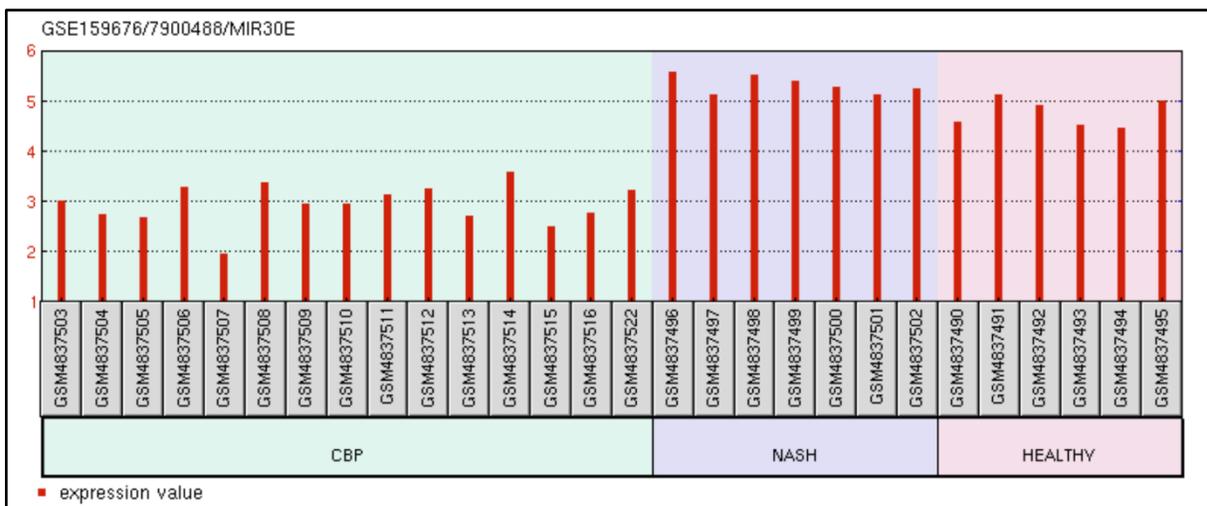


Figure 17 : Représentation par histogramme du taux d’expression de miR30E chez les groupes d’étude (CBP, NASH, témoins sains).

Les résultats obtenus de TCGA portal au niveau du tissu hépatique pourraient confirmer que le miR30E cible le gène **EIF3G** qui code pour un composant du complexe de facteur d'initiation de la traduction eucaryote 3 (eIF-3), qui est requis pour plusieurs étapes de l'initiation de la traduction. Le complexe eIF-3 cible et initie spécifiquement la traduction d'un sous-ensemble d'ARNm impliqués dans la prolifération cellulaire, y compris le cycle cellulaire, la différenciation et l'apoptose. (Lee AS et al.,2015)

D'après les résultats retrouvés des gènes exprimés de manière différentielle (**Figure18**), le gène EIF3G (p-valu = 3.75e-09) est surexprimé chez les patients atteints de CBP avec une différence significative (p < 0.05) par rapport au groupe de patients atteints de NASH.

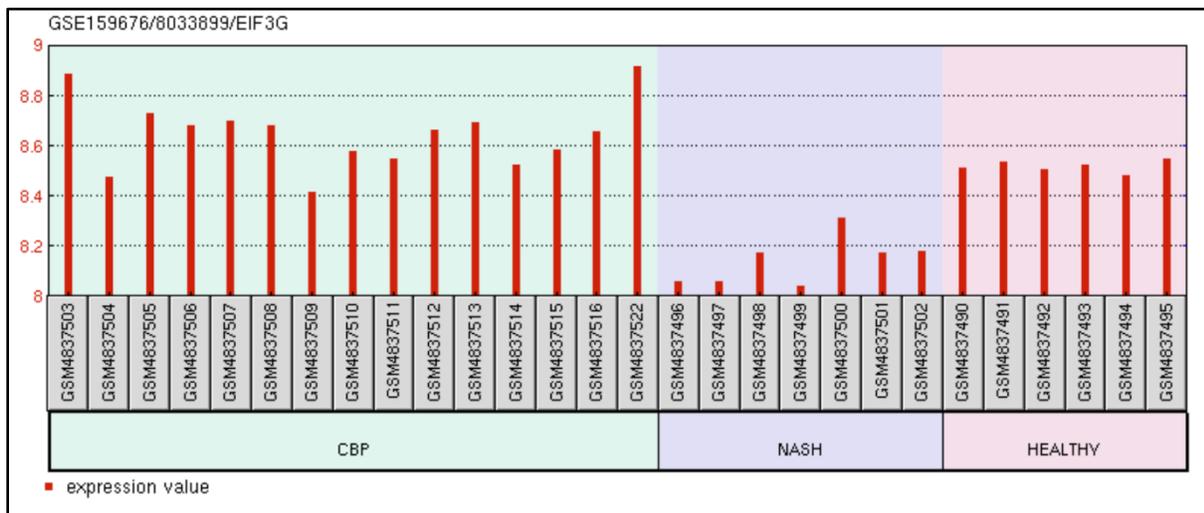


Figure18: Représentation par histogramme du taux d'expression du gène EIF3G chez les groupes d'étude (CBP, NASH, témoins sains).

Le gène EIF3G fait partie des composants de liaison à l'ARN du complexe facteur d'initiation de la traduction eucaryote 3 (eIF-3), qui est nécessaire pour plusieurs étapes dans l'initiation de la synthèse des protéines, Le complexe eIF-3 cible et initie spécifiquement la traduction d'un sous-ensemble d'ARNm impliqués dans la prolifération cellulaire, y compris le cycle cellulaire, la différenciation et l'apoptose, et utilise différents modes de liaison de l'ARN tige-boucle pour exercer une activation traductionnelle ou une répression.(MamikoMet al.,2007)

Cependant, le miR30E pourrait avoir un double rôle dans le carcinome hépatocellulaire ; un rôle suppresseur de tumeur et un rôle d'oncogène. (Gramantieri L et al., 2020)

Il a déjà été démontré que l'apoptose est liée à la physiopathologie de la CBP ce qui constitue un appui pour dire que le miR-30E pourrait avoir un rôle protecteur. (Figure19)

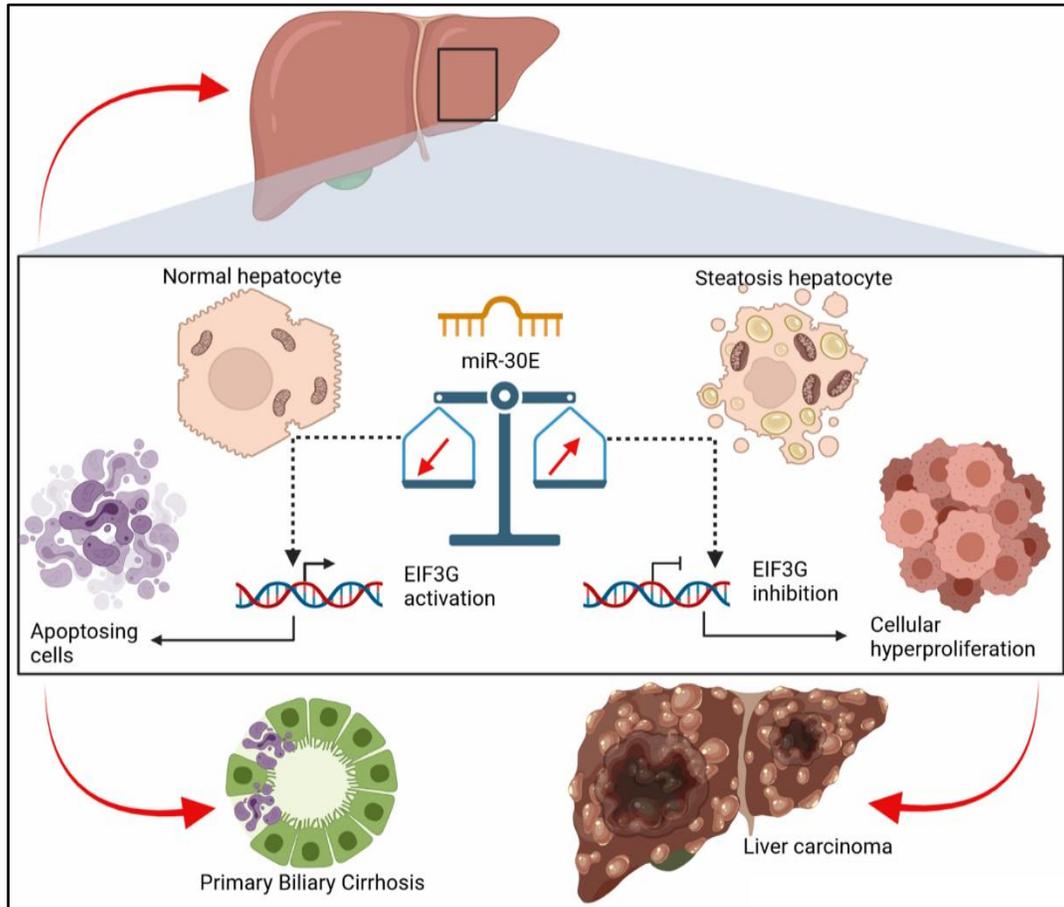


Figure19: Représentation schématique du double rôle de miR-30 E. (Seninet et al., 2021 Unpublished data)

- **miR192** est sous-exprimé chez les patients atteints de CBP avec une différence significative $p < 0.05$, par rapport à son expression chez les patients atteint de NASH ainsi qu'aux témoins sains où le miR192 est retrouvé exprimé avec des taux plus élevés relativement au groupe de patient NASH mais sans aucune différence significative ($p > 0.05$). (figure20)

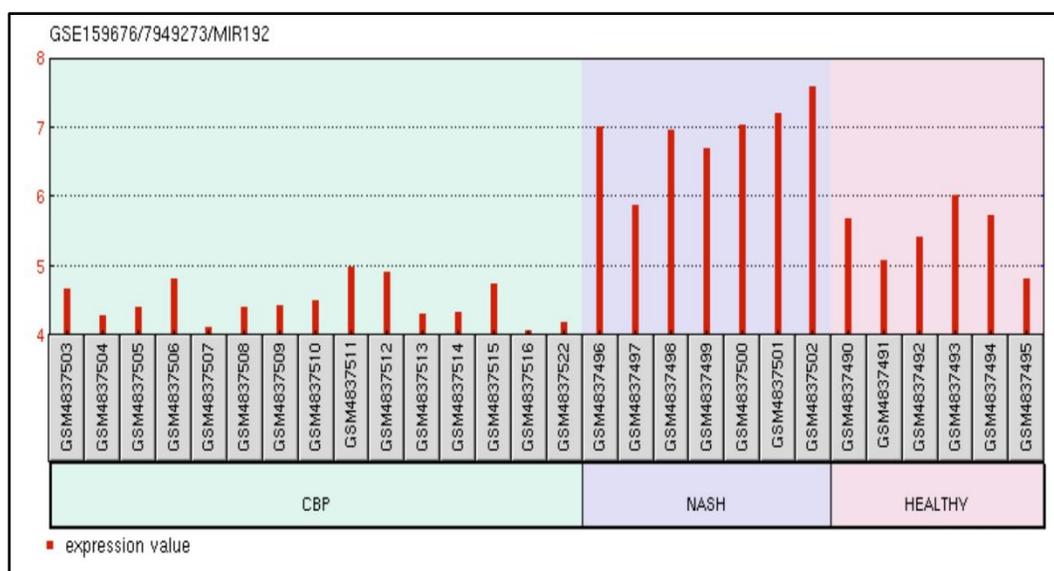


Figure 20: Représentation graphique du taux d’expression de miR192 chez les 3 groupes étudiés (CBP, NASH, témoins sains).

Le niveau sérique de miR-192 est considérablement réduit dans la cirrhose qui évolue en carcinome hépatocellulaire, lors d'une infection par le virus de l'hépatite B (**Tan et al., 2015**).

Le miR-192 circulant est une molécule flexible et contribue à la progression de diverses maladies du foie liées au VHB. Ce qui démontre le rôle offensif du miR-192 dans la NASH. (**FujiaRenetal.,2021**)

Selon (**Pichiorri., et al 2010**), le mir-192 est considéré comme un régulateur positif de p53, un suppresseur de tumeur humain.

Il est également surexprimé dans le cancer gastrique, et pourrait être utilisé comme biomarqueur ou cible thérapeutique. Il a également été suggéré que mir-192 pourrait être utilisé comme biomarqueur pour les dommages au niveau du foie induits par les médicaments. (**Jin Z et al.,2011**)

- **miRLET7C** est sous-exprimé chez les patients atteints de CBP avec une différence significative $p < 0.05$, par rapport à son expression chez les patients atteint de NASH ainsi qu’aux témoins sains où le miRLET7C est retrouvé plus exprimé chez les patients atteints de NASH relativement aux témoins, cependant sans aucune différence significative notée ($p > 0.05$). (**Figure 21**)

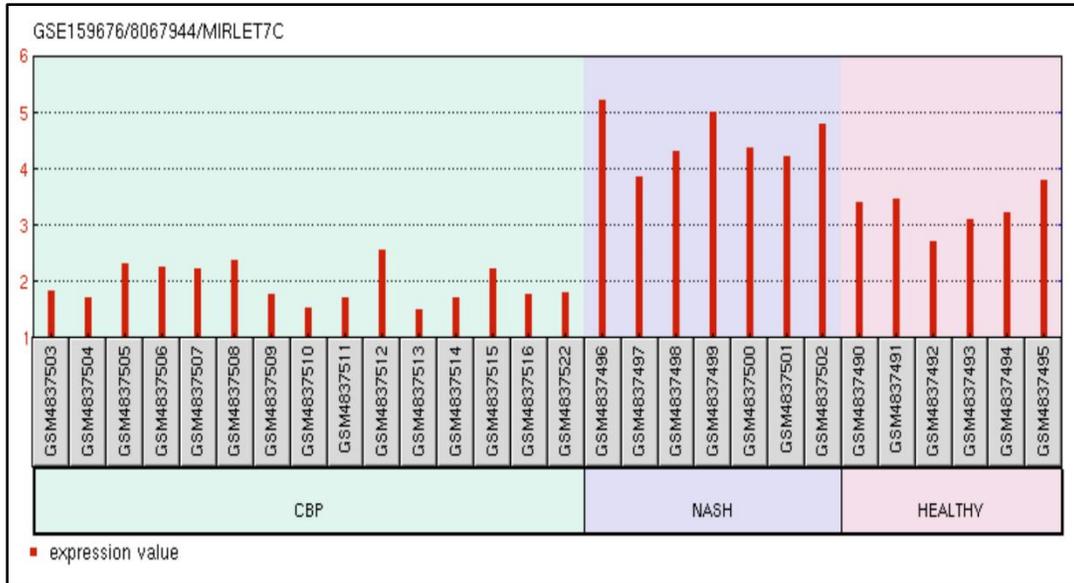


Figure 21 : Représentation graphique du taux d’expression de miR-LET7C chez les 3 groupes étudiés (CBP, NASH, témoins sains).

D’après les résultats obtenus par TCGA portal le miR-LET7C ciblerait le gène **ADAM9** qui code pour disintegrin and metalloprotease 9 qui est impliquée dans différents processus biologiques tels que les interactions cellule-cellule et cellule-matrice extra cellulaire.

La surexpression du gène **ADAM9** (Figure 22) favorise la progression tumorale, la résistance thérapeutique et la métastase des cancers. (Chou *et al.*, 2020)

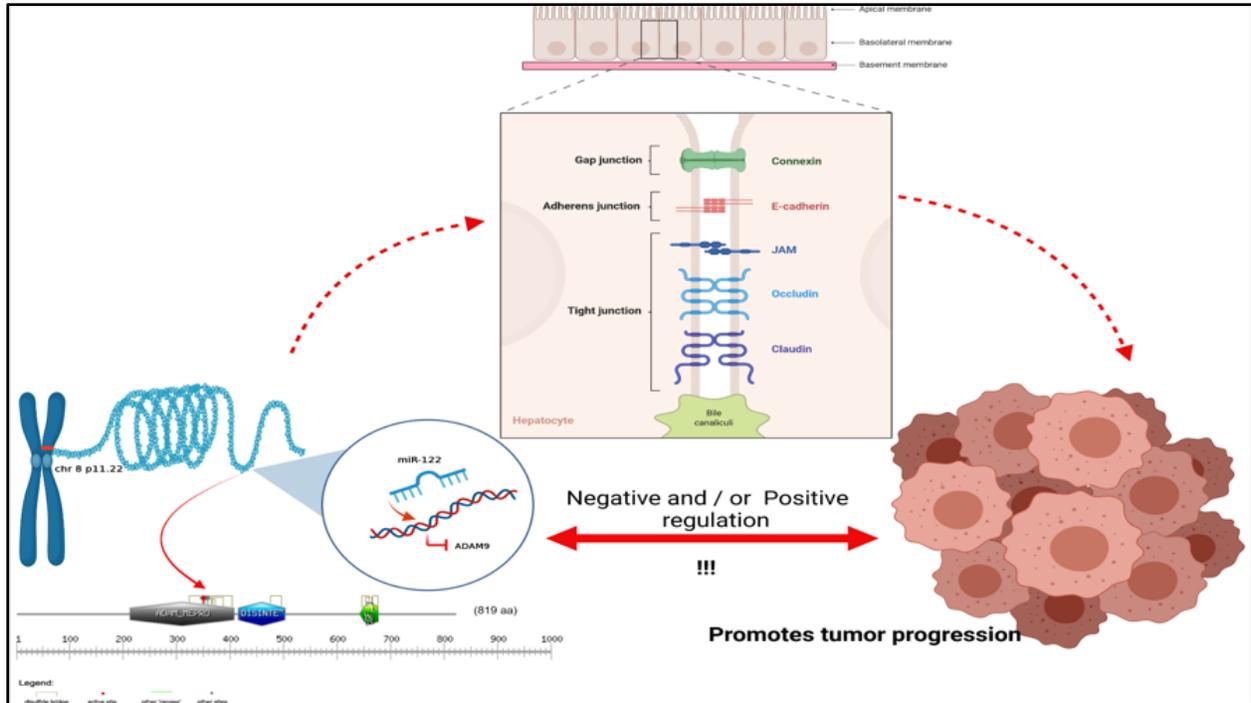


Figure 22 : Représentation schématique illustrant le rôle possible de miR-LET7C dans l’atteinte hépatique. (Seninet *et al.*, 2021 Unpublished data)

D’après les résultats retrouvés à partir des gènes exprimés de manière différentielle, il a été également décelé 4 autres miR à savoir : miR99a, miR15a, miRLET7G et le miR503. Les gènes cibles de ces quatre derniers mirs n’ont pas été retrouvés parmi les gènes exprimés de manière différentielle chez les 3 groupes d’étude. La description et la fonction des quatre miRNAsont représentées dans le **Tableau IV**.

Tableau IV: Description des miR99a, miR15a, miRLET7G et le miR503.

ID	P.val	Gene symbole	Chr localisation	Fonction
8067942	3.42e-07	Mir99A	21q21-1	Suppression de la prolifération et la migration des cellules dans le cancer du foie en ciblant le gène HOXA1.(Tao et al.,2019)
7971661	4.40e-06	Mir15A	13q14-2	Suppresseur de tumeur dans le neuroblastome en ciblant le proto-oncogène MYCN. (Chava S et al.,2020)
8087881	3.11e-05	MirLET7G	3p21-1	Régule la prolifération cellulaire et l'apoptose des cellules de l'hépatome.(Wu L et al.,2014)
8175261	4.13e-09	Mir503	Xq26.3	Suppresseur de tumeur pas ses effets sur les gènes cibles régulant la prolifération, la migration et l'invasion cellulaires.(Gupta G et al.,2018)

Conclusion

La cirrhose biliaire primitive est caractérisée par la destruction progressive des petits canaux biliaires intra-hépatiques, dont les autoanticorps responsables de cette destruction sont de deux types : les anticorps anti-mitochondrie de type M2 (AMA M2) et les anticorps anti-nucléaires (ANA) [anti-membrane nucléaire « anti-gp210 » et anti pores nucléaire « anti-Sp100 »].

L'apoptose est l'un des mécanismes impliqués dans la destruction des cellules épithéliales biliaires. Les micro-ARN sont des régulateurs importants de l'apoptose.

Notre étude nous a permis d'identifier 9 micro-ARN exprimés de manière différentielle :

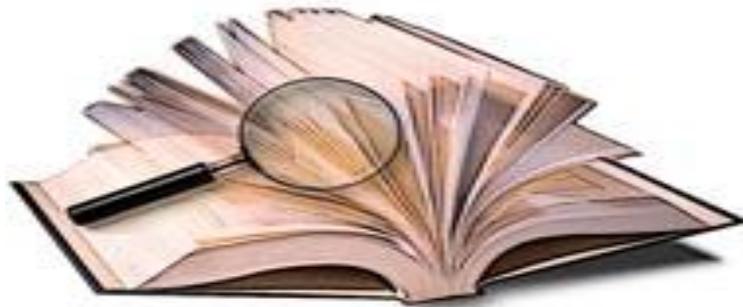
- Le miR-122, miR-30^e, miR-15A, miR-99A, miR-192, miR-LET7C et miR-LET7G sont sous exprimés chez les patients CBP.
- Le miR-192 est surexprimé chez les patients atteints de NASH
- Le miR-LET7BHG est surexprimé chez les 2 groupes d'étude : NASH et CBP alors qu'il est sous exprimé chez les témoins sains.

Nous avons aussi constaté que :

- Le mir-122 ciblerait les gènes *ADAM10*, *IGF1R*, *CCNG1* et *ADAM17* qui sont impliqués dans la tumorigenèse.
- Le gène *IGFBP* est surexprimé chez les patients atteints de CBP, l'IGFBP1 pourrait être un régulateur négatif de la voie p53/BAK-dépendante de l'apoptose.
- Le miR-30E ciblerait le gène *EIF3G* qui est surexprimé chez les patients atteints de CBP.
- Le miR-15A ciblerait le gène *GDF11* qui favorise la fibrose.
- Le miR-192 ciblerait le gène *APEX1* qui code pour une enzyme endonucléase AP impliquée dans la réparation de l'ADN.
- Le miR-99A ciblerait le gène *HOXA1* qui code pour un facteur de transcription spécifique qui pourrait être impliqué dans plusieurs processus de développement cellulaire.
- Le miR-LET7G ciblerait le gène *DCLER1C* impliqué dans la recombinaison VDJ et dans la réparation de l'ADN.
- Le miR-LET7C ciblerait le gène *ADAM9* qui favorise la progression tumorale.

Cette étude a été menée dans le but de chercher de nouvelles perspectives dans la thérapie de la CBP en utilisant les micro-ARN protecteurs pour le traitement de la maladie en premier temps et en second temps de valoriser ces résultats pour créer un test PCR multiplex, ce qui pourrait être réalisé grâce à la RT-PCR de la « next » génération (MuDT) qui permet de détecter et de quantifier plusieurs cibles simultanément et cela dans une seule chaîne fluorescente, comme un test de pronostic et de diagnostic pour cette pathologie.

Les références bibliographiques :



A

Antonini Teresa Maria (2016). Centre Hépatobiliaire - Hôpital Universitaire Paul Brousse.

B

Bowlus, C. L., & Gershwin, M. E. (2014). The diagnosis of primary biliary cirrhosis. *Autoimmunity reviews*, 13(4-5), 441–444.

C

Ciszak et al(2002). « Structural basis for flip-flop action of thiamin pyrophosphate-dependent enzymes revealed by human pyruvate dehydrogenase » dans *J. Biol. Chem.*, 2002, 278, 21240-21246.

Chantrana,Y., Corpechot,C., Haddouk,D., Gaouar,F., Ballot,E., Duclos-Vallée,JC., Chazouillères,O et Johanet,C (2014) Anticorps anti-gp210 et anticorps anti-Sp100 dans la cirrhose biliaire primitive : une association de très mauvais pronostic, Revue Francophone des Laboratoires, n°464 :21-23

Chava S, Reynolds CP, Pathania AS, Gorantla S, Poluektova LY, Coulter DW, Gupta SC, Pandey MK, Challagundla KB (2020). miR-15a-5p, miR-15b-5p, and miR-16-5p inhibit tumor progression by directly targeting MYCN in neuroblastoma. *Mol Oncol.* 2020 Jan;14(1):180-196..

Chou CW, Huang YK, Kuo TT, Liu JP, Sher YP (2020). An Overview of ADAM9: Structure, Activation, and Regulation in Human Diseases. *Int J Mol Sci.* 2020 Oct 21;21(20):7790.

Coulouarn, C; Factor, V M, Andersen, J B, Durkin, M E, Thorgeirsson, S S (octobre 2009). « La perte d'expression de miR-122 dans le cancer du foie est corrélée avec la suppression du phénotype hépatique et le gain de propriétés métastatiques ». *Oncogène.* 28 (40) : 3526 à 3536. doi:10.1038/onc.2009.211.

D

David Q.-H., Wang Brent A., Neuschwander-Tetri Piero Portincasa (2016). The Biliary System, Second Edition Colloquium Series on Integrated Systems Physiology: From Molecule to Function (2016), 178 pages.

Deng X, Zhen P, Niu X, Dai Y, Wang Y, Zhou M (2020). APE1 promotes proliferation and migration of cutaneous squamous cell carcinoma. *J Dermatol Sci.* 2020 Oct;100(1):67-74.

F

Frohlich J, Kovacovicova K, Mazza T, Emma MR, Cabibi D, Foti M, Sobolewski C, Oben JA, Peyrou M, Villarroya F, Soresi M, Rezzani R, Cervello M, Bonomini F, Alisi A, Vinciguerra M (2020). GDF11 induces mild hepatic fibrosis independent of metabolic health. *Aging (Albany NY)*. 2020 Oct 28;12(20):20024-20046.

G

Gramantieri L, Pollutri D, Gagliardi M, Giovannini C, Quarta S, Ferracin M, Casadei-Gardini A, Callegari E, De Carolis S, Marinelli S, Benevento F, Vasuri F, Ravaioli M, Cescon M, Piscaglia F, Negrini M, Bolondi L, Fornari F (2020). MiR-30e-3p Influences Tumor Phenotype through *MDM2/TP53* Axis and Predicts Sorafenib Resistance in Hepatocellular Carcinoma. *Cancer Res*. 2020 Apr 15;80(8):1720-1734.

Gupta G, Chellappan DK, de Jesus Andreoli Pinto T, Hansbro PM, Bebawy M, Dua K(2018). Tumor suppressor role of miR-503. *Panminerva Med*. 2018 Mar;60(1):17-24. doi: 10.23736/S0031-0808.17.03386-9. Epub 2017 Nov 22. PMID: 29164842.

H

Hirschfield GM, Dyson JK, Alexander GJM, Chapman MH, Collier J, Hübscher S, Patanwala I, Pereira SP, Thain C, Thorburn D, Tiniakos D, Walmsley M, Webster G, Jones DEJ (2018). The British Society of Gastroenterology/UK-PBC primary biliary cholangitis treatment and management guidelines. *Gut*. 2018 Sep;67(9):1568-1594.

Housset, Guechot. Fibrose hépatique(1999) : Physiopathologie et diagnostic biologique. *Pathologie et biologie*, 1999, vol. 47, no 9, p. 873-1032.

Hsu SH, Wang B, Kota J, Yu J, Costinean S, Kutay H, Yu L, Bai S, La Perle K, Chivukula RR, Mao H, Wei M, Clark KR, Mendell JR, Caligiuri MA, Jacob ST, Mendell JT, Ghoshal K(2012). Essential metabolic, anti-inflammatory, and anti-tumorigenic functions of miR-122 in liver. *J Clin Invest*. 2012 Aug;122(8):2871-83.

J

Jakson.A., Tenhaken.RK., Roberston.JM., et al (1995) Analysis of chemical complication data for radation hepatitis using a parallel architecture model, *Int J Radiat Oncol 30*il phys, n°31: 833-91.

Jessica,K., Dyson,M., Hirschfield,G., David,H., Adams., Beuers,H., Derek,A., Mann., Keith,D., Lindor et Jones,EJ (2015) Novel therapeutic targets in primary biliary cirrhosis, *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology* n°12, 147-158

K

Kawata K, Kobayashi Y, Gershwin ME, Bowlus CL (2012). The immunophysiology and apoptosis of biliary epithelial cells: primary biliary cirrhosis and primary sclerosing cholangitis. *Clin Rev Allergy Immunol.* 2012 Dec;43(3):230-41.

Khvorova A, Reynolds A et Jayasena SD.,(2003) « Functional siRNAs and miRNAs exhibit strand bias. », *Cell*, vol. 115, no 2, 2003, p. 209-16 (PMID 14567918, DOI 10.1016/s0092-8674(03)00801-8).

Korwin,JD (2014) Cour maladies autoimmunes du foie Département de Médecine interne, CHU Nancy-Hôpitaux de Brabois-BPC Université de Lorraine AMMPU.

Kouroumalis E, Notas G (2015). Primary biliary cirrhosis: From bench to bedside. *World J Gastrointest Pharmacol Ther.* 2015 Aug 6;6(3):32-58

L

Landgraf P,Rusu M, Sheridan R,Sewer A, Iovino N, Aravin A, Pfeffer S, Rice A,Kamphorst AO, Landthaler M,Lin C, Socci ND, Hermida L, Fulci V,Chiaretti S, Foa R,Schliwka J, Fuchus U, Novosel A, Muller RU, Schermer B, Bissels U, Inman J, Phan Q, Chien MCell(2007). A mammalian microRNA expression atlas based RNA library sequencing 129:1401-1414(2007).

Lee AS, Kranzusch PJ, Cate JH (2015). eIF3 targets cell-proliferation messenger RNAs for translational activation or repression. *Nature.* 2015 Jun 4;522(7554):111-4.

Lleo A, Leung PSC, Hirschfield GM, Gershwin EM (2020). The Pathogenesis of Primary Biliary Cholangitis: A Comprehensive Review. *Semin Liver Dis.* 2020 Feb;40(1):34-48

Lui WO, Pourmand N, Patterson BK, Fire A(2007). Patterns of known and novel small RNAs in human cervical cancer. *Cancer Res.* 2007 Jul 1;67(13):6031-43.

M

Marin JJ, Macias RI, Briz O, Banales JM, Monte MJ (2015). Bile Acids in Physiology, Pathology and Pharmacology. *Curr Drug Metab.* 2015;17(1):4-29.

Mamiko Masutani, Nahum Sonenberg, Shigeyuki Yokoyama, Hiroaki Imataka, Reconstitution reveals the functional core of mammalian eIF3, EMBO (2007). 2007 Jul 25;26(14):3373-83. doi: 10.1038/sj.emboj.7601765.

Marzorati S, Lleo A, Carbone M, Gershwin ME, Invernizzi P (2016). The epigenetics of PBC: The link between genetic susceptibility and environment. *Clin Res Hepatol Gastroenterol.* 2016 Dec;40(6):650-659.

N

N Dianat et coll (2014). Generation of functional cholangiocyte-like cells from human pluripotent stem cells and HepaRG cells. *Hepatology*, édition en ligne avancée du 9 avril 2014.

Nakagawa R, Muroyama R, Saeki C, Goto K, Kaise Y, Koike K, Nakano M, Matsubara Y, Takano K, Ito S, Saruta M, Kato N, Zeniya M (2017). miR-425 regulates inflammatory cytokine production in CD4⁺ T cells via N-Ras upregulation in primary biliary cholangitis. *J Hepatol.* 2017 Jun;66(6):1223-1230

Natalie A. Molodecky, Hashim Kareemi, Rohan Parab, Herman W. Barkema, Hude Quan, Robert P. Myers, Gilaad G. Kaplan (2011). Incidence de la cholangite sclérosante primitive : revue systématique et méta-analyse. Première publication: 23 février 2011

O

Okamura K, Phillips MD, Tyler DM, Duan H, Chou YT et Lai EC (2008). « The regulatory activity of microRNA* species has substantial influence on microRNA and 3' UTR evolution. », *Nat StructMol Biol.*, vol. 15, no 4, 2008, p. 354-63 (PMID 18376413, DOI 10.1038/nsmb.1409.

Oriana, C et Denis, C (2015) . Le Foie et les Voies biliaires : Anatomie, Centre Hépatobiliaire Paul Brousse.

P

Pichiorri F, Suh SS, Rocci A, De Luca L, Taccioli C, Santhanam R, Zhou W, Benson DM, Hofmainster C, Alder H, Garofalo M, Di Leva G, Volinia S, Lin HJ, Perrotti D, Kuehl M, Aqeilan RI, Palumbo A, Croce CM (Oct 2010). "Downregulation of p53-inducible microRNAs 192, 194, and 215 impairs the p53/MDM2 autoregulatory loop in multiple myeloma development". *Cancer Cell.* 18 (4): 367–81. doi:10.1016/j.ccr.2010.09.005.

Purohit T, Cappell MS. Primary biliary cirrhosis: Pathophysiology, clinical presentation and therapy. *World J Hepatol.* 2015 May 8;7(7):926-41.

S

Seninet El Hadi., Saadi Lila., Belhocine Mohamed(2021). IUIS-ALACI-Immuno-Colombo2021.

T

Tanaka A, Leung PSC, Gershwin ME (2018). Evolution of our understanding of PBC. *Best Pract Res Clin Gastroenterol.* 2018 Jun-Aug;34-35:3-9.

Tao C, Sun H, Sang W, Li S (2019). miRNA-99a inhibits cell invasion and migration in liver cancer by directly targeting *HOXA1*. *Oncol Lett.* 2019 Jun;17(6):5108-5114.

Tischfield MA, Bosley TM, Salih MA, Alorainy IA, Sener EC, Nester MJ, Oystreck DT, Chan WM, Andrews C, Erickson RP, Engle EC(2005). Homozygous *HOXA1* mutations disrupt human brainstem, inner ear, cardiovascular and cognitive development. *Nat Genet.* 2005 Oct;37(10):1035-7.

Tsai, Wei-Chih; Hsu, Paul Wei-Che, Lai, Tsung-Ching, Chau, Gar-Yang, Lin, Ching-Wen, Chen, Chun-Ming, Lin, Chien-Der, Liao, Yu-Lun, Wang, Jui-Ling, Chau, Yat-Pang, Hsu, Ming-Ta, Hsiao, Michael, Huang, Hsien-Da, Tsou, Ann-Ping (mai 2009). « MicroRNA-122, a tumor suppressor microRNA that regulates intrahepatic metastasis of hepatocellular carcinoma ». *Hépatologie.* 49 (5): 1571-1582. doi:10.1002/hep.22806.

W

Webb GJ, Siminovitch KA, Hirschfield GM (2015). The immunogenetics of primary biliary cirrhosis: A comprehensive review. *J Autoimmun.* 2015 Nov;64:42-52.

Weskamp G, Krätzschmar J, Reid MS, Blobel CP (1996). MDC9, a widely expressed cellular disintegrin containing cytoplasmic SH3 ligand domains. *J Cell Biol.* 1996 Feb;132(4):717-26.

Wu L, Wang Q, Yao J, Jiang H, Xiao C, Wu F (2015). MicroRNA let-7g and let-7i inhibit hepatoma cell growth concurrently via downregulation of the anti-apoptotic protein B-cell lymphoma-extra large. *Oncol Lett.* 2015 Jan;9(1):213-218

X

Xia Y, Zhen L, Li H, Wang S, Chen S, Wang C, Yang X (2021). MIRLET7BHG promotes hepatocellular carcinoma progression by activating hepatic stellate cells through exosomal SMO to trigger Hedgehog pathway. *Cell Death Dis.* 2021 Mar 26;12(4):326.

Y

Yang YF, Pan YH, Tian QH, Wu DC, Su SG (2018). CBX1 Indicates Poor Outcomes and Exerts Oncogenic Activity in Hepatocellular Carcinoma. *Transl Oncol.* 2018 Oct;11(5):1110-1118.

Z

Zhang H, Carbone M, Lleo A, Invernizzi P (2015). Geoepidemiology, Genetic and Environmental Risk Factors for PBC. *Dig Dis.* 2015;33 Suppl 2:94-101.

Liste des Annexes

R Script:

```

• # Version info: R 3.2.3, Biobase 2.30.0, GEOquery 2.40.0, limma 3.26.8
• #####
• # Differential expression analysis with limma
• library(GEOquery)
• library(limma)
• library(umap)
•
• # load series and platform data from GEO
•
• gset<- getGEO("GSE159676", GSEMatrix =TRUE, AnnotGPL=TRUE)
• if (length(gset) > 1) idx<- grep("GPL6244", attr(gset, "names")) else idx<- 1
• gset<- gset[[idx]]
•
• # make proper column names to match toptable
• fvarLabels(gset) <- make.names(fvarLabels(gset))
•
• # group membership for all samples
• gsms<- "00000011111122222222222233344X43"
• sml<- strsplit(gsms, split="")[[1]]
•
• # filter out excluded samples (marked as "X")
• sel<- which(sml != "X")
• sml<- sml[sel]
• gset<- gset[,sel]
•
• # log2 transformation
• ex <- exprs(gset)
• qx<- as.numeric(quantile(ex, c(0., 0.25, 0.5, 0.75, 0.99, 1.0), na.rm=T))
• LogC<- (qx[5] > 100) ||
•         (qx[6]-qx[1] > 50 &&qx[2] > 0)
• if (LogC) { ex[which(ex <= 0)] <- NaN
• exprs(gset) <- log2(ex) }
•
• # assign samples to groups and set up design matrix
• gs<- factor(sml)
• groups <- make.names(c("Healthy","NASH","PSC","PBC","AIH"))
• levels(gs) <- groups
• gset$group<- gs
• design <- model.matrix(~group + 0, gset)
• colnames(design) <- levels(gs)
•
• fit <- lmFit(gset, design) # fit linear model
•
• # set up contrasts of interest and recalculate model coefficients
• cts<- c(paste(groups[1],"-",groups[2],sep=""), paste(groups[1],"-",groups[4],sep=""),
• paste(groups[4],"-",groups[5],sep=""))
• cont.matrix<- makeContrasts(contrasts=cts, levels=design)
• fit2 <- contrasts.fit(fit, cont.matrix)

```

```

•
• # compute statistics and table of top significant genes
• fit2 <- eBayes(fit2, 0.01)
• tT<- topTable(fit2, adjust="fdr", sort.by="B", number=250)
•
• tT<- subset(tT, select=c("ID","adj.P.Val","P.Value","F","Gene.symbol","Gene.title"))
• write.table(tT, file=stdout(), row.names=F, sep="\t")
•
• # Visualize and quality control test results.
• # Build histogram of P-values for all genes. Normal test
• # assumption is that most genes are not differentially expressed.
• tT2 <- topTable(fit2, adjust="fdr", sort.by="B", number=Inf)
• hist(tT2$adj.P.Val, col = "grey", border = "white", xlab = "P-adj",
• ylab = "Number of genes", main = "P-adj value distribution")
•
• # summarize test results as "up", "down" or "not expressed"
• dT<- decideTests(fit2, adjust.method="fdr", p.value=0.05)
•
• # Venn diagram of results
• vennDiagram(dT, circle.col=palette())
•
• # create Q-Q plot for t-statistic
• t.good<- which(!is.na(fit2$F)) # filter out bad probes
• qqf(fit2$t[t.good], fit2$df.total[t.good], main="Moderated t statistic")
•
• # volcano plot (log P-value vs log fold change)
• colnames(fit2) # list contrast names
• ct<- 1 # choose contrast of interest
• volcanoplot(fit2, coef=ct, main=colnames(fit2)[ct], pch=20,
• highlight=length(which(dT[,ct]!=0)), names=rep('+', nrow(fit2)))
•
• # MD plot (log fold change vs mean log expression)
• # highlight statistically significant (p-adj< 0.05) probes
• plotMD(fit2, column=ct, status=dT[,ct], legend=F, pch=20, cex=1)
• abline(h=0)
•
• #####
• # General expression data analysis
• ex <- exprs(gset)
•
• # box-and-whisker plot
• dev.new(width=3+ncol(gset)/6, height=5)
• ord<- order(gs) # order samples by group
• palette(c("#1B9E77", "#7570B3", "#E7298A", "#E6AB02", "#D95F02",
• "#66A61E", "#A6761D", "#B32424", "#B324B3", "#666666"))
• par(mar=c(7,4,2,1))
• title <- paste ("GSE159676", "/", annotation(gset), sep = "")
• boxplot(ex[,ord], boxwex=0.6, notch=T, main=title, outline=FALSE, las=2,
• col=gs[ord])
• legend("topleft", groups, fill=palette(), bty="n")

```

- dev.off()
-
- # expression value distribution
- par(mar=c(4,4,2,1))
- title <- paste ("GSE159676", "/", annotation(gset), " value distribution", sep = "")
- plotDensities(ex, group=gs, main=title, legend ="topright")
-
- # UMAP plot (dimensionality reduction)
- ex <- na.omit(ex) # eliminate rows with NAs
- ex<- ex[!duplicated(ex),] # remove duplicates
- ump <- umap(t(ex), n_neighbors = 13, random_state = 123)
- par(mar=c(3,3,2,6), xpd=TRUE)
- plot(ump\$layout, main="UMAP plot, nbrs=13", xlab="", ylab="", col=gs, pch=20, cex=1.5)
- legend("topright", inset=c(-0.15,0), legend=levels(gs), pch=20,
- col=1:nlevels(gs), title="Group", pt.cex=1.5)
- library("maptools") # point labels without overlaps
- pointLabel(ump\$layout, labels = rownames(ump\$layout), method="SANN", cex=0.6)
-
- # mean-variance trend, helps to see if precision weights are needed
- plotSA(fit2, main="Mean variance trend, GSE159676")

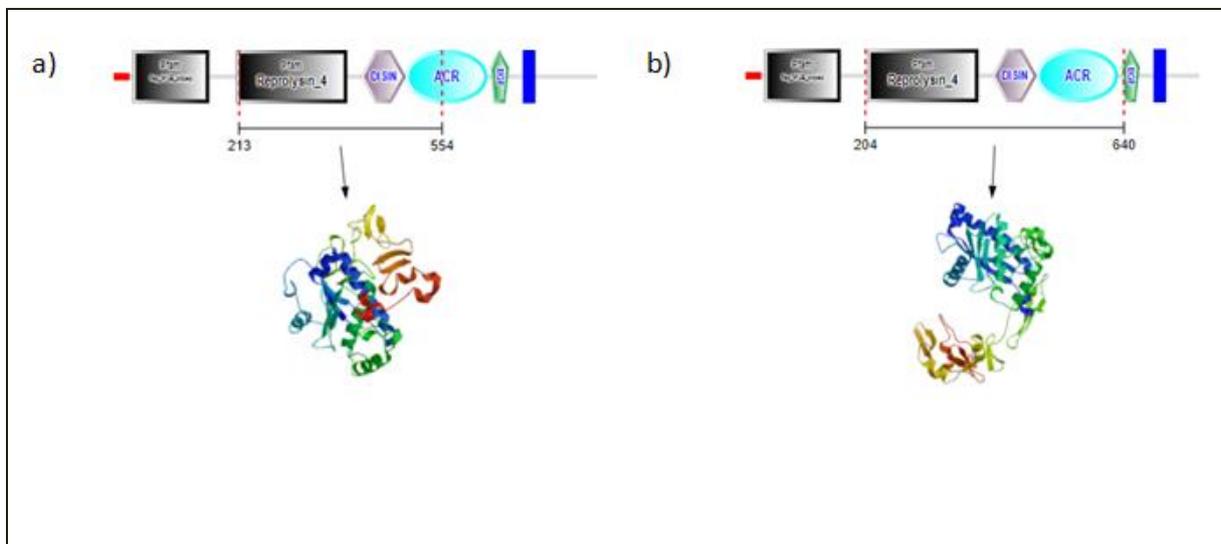


Figure23: Représentation du gèneADAM9. a) modèle d’homologie (Q13443/6bDZc) dont le pourcentage d’identité est: 28.6%. b) Modèle d’homologie (Q13443/2eroA) dont le pourcentage d’identité est: 39.4%.

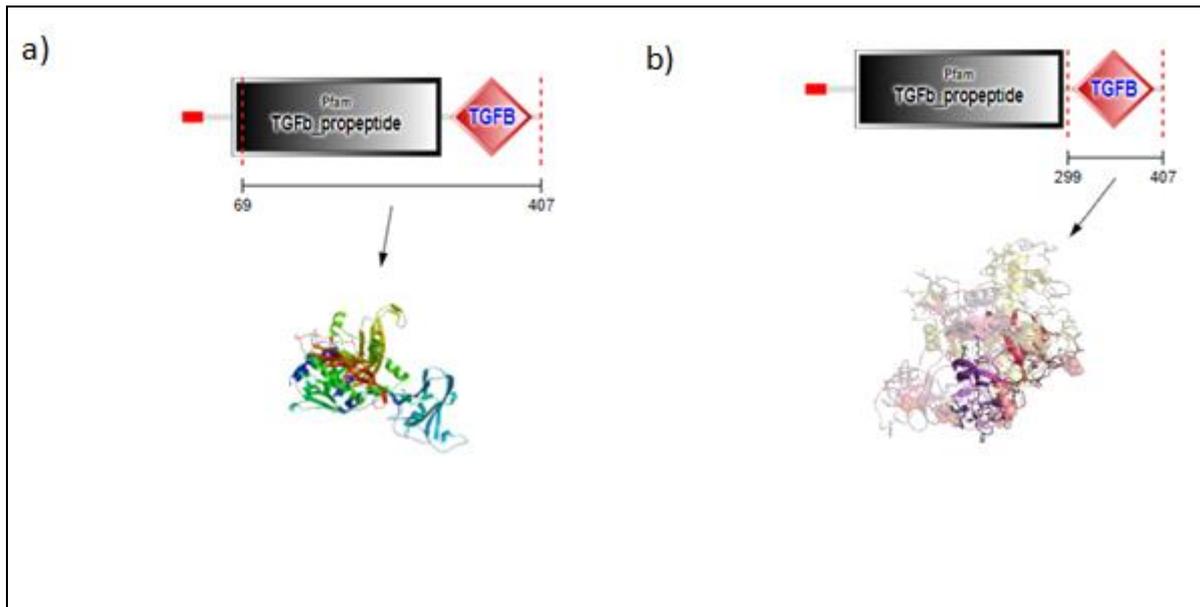


Figure 24 : Représentation du gèneGDF11 : **a)** modèle Homologue (O95390/5ntuA) dont le pourcentage d’identité est : 66.6%. **b)** PDB structure (5jhw) dont le pourcentage d’identité est :100%.

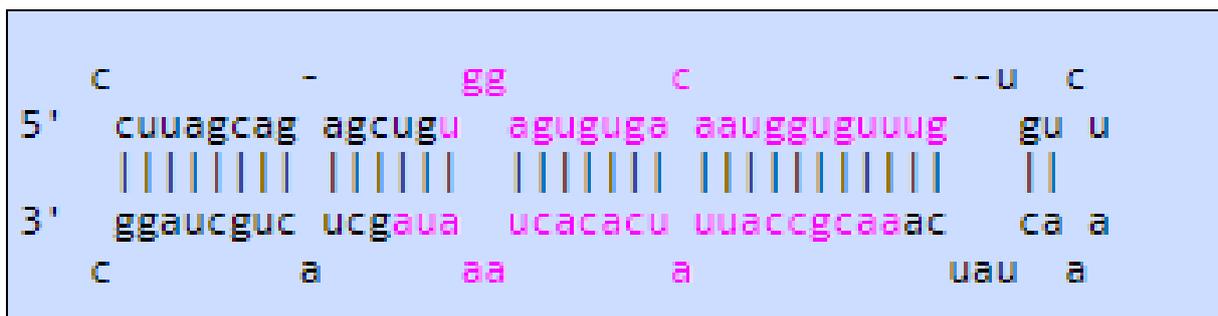


Figure 25: Structures-en epingle à cheveux de la séquence du miR-122. (Landgraf P et al.,2007)

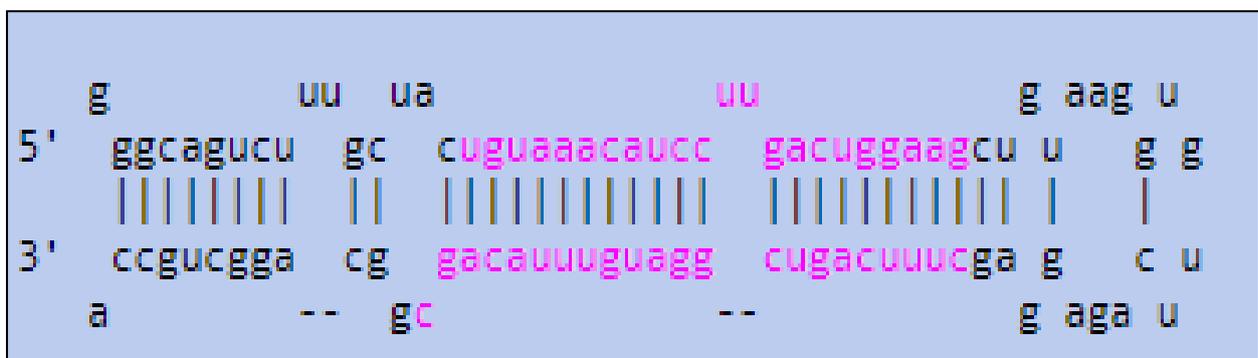


Figure26:Structure en épingle à cheveux de la séquence du miR30E. (Lui W et al., 2007)



Figure27 : Représentation par histogramme de miR99A chez les 3 groupes étudiés (CBP,NASH, témoins sains). **.(Landgraf P et al.,2007)**

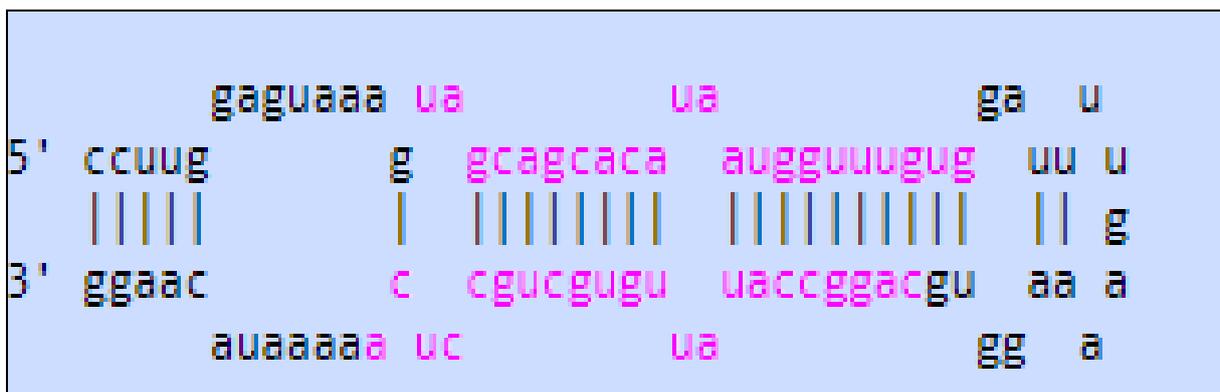


Figure28 : Représentation de la structure en épingle à cheveux de la séquence du miR-15A. **.(Landgraf P et al.,2007)**

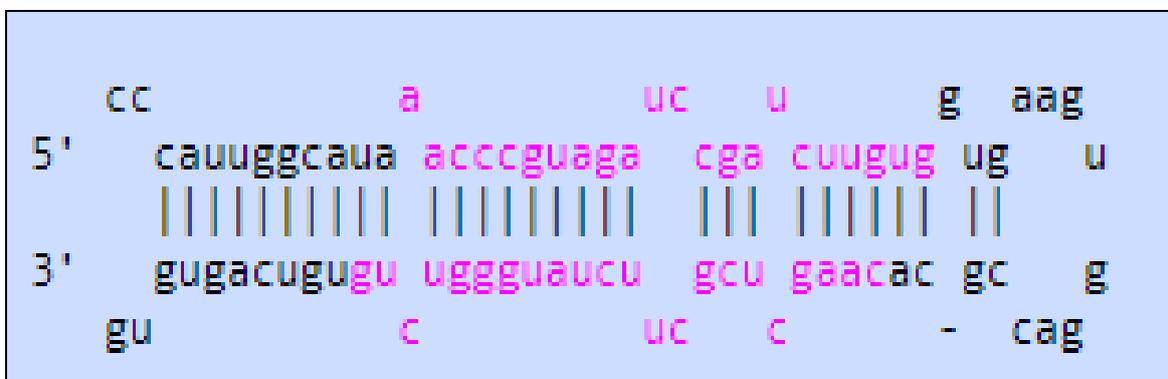


Figure 29: Représentation de la structure en épingle à cheveux de la séquence du miR-99A. **.(Landgraf P et al.,2007)**

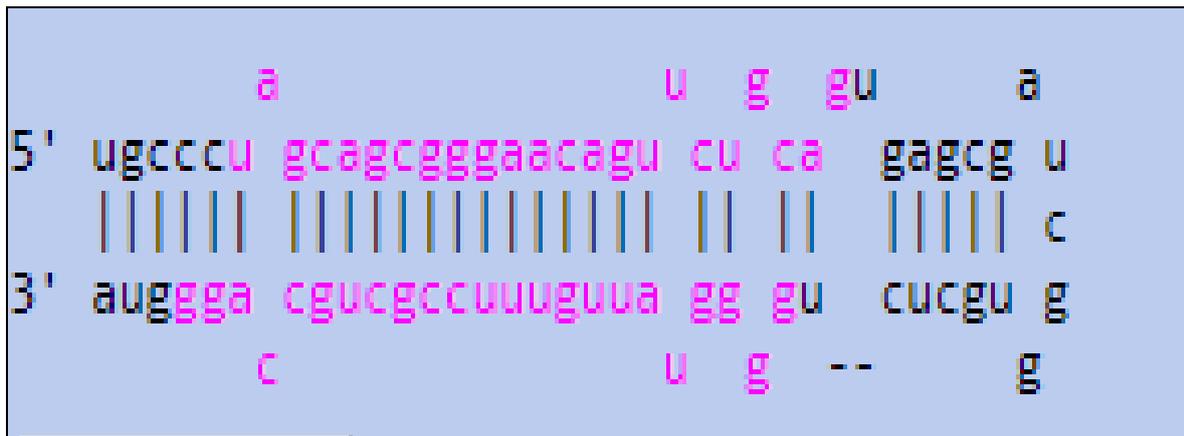


Figure 30 : Représentation de la structure en épingle en à cheveux de la séquence du miR-503.
 .(Landgraf P *et al.*,2007)

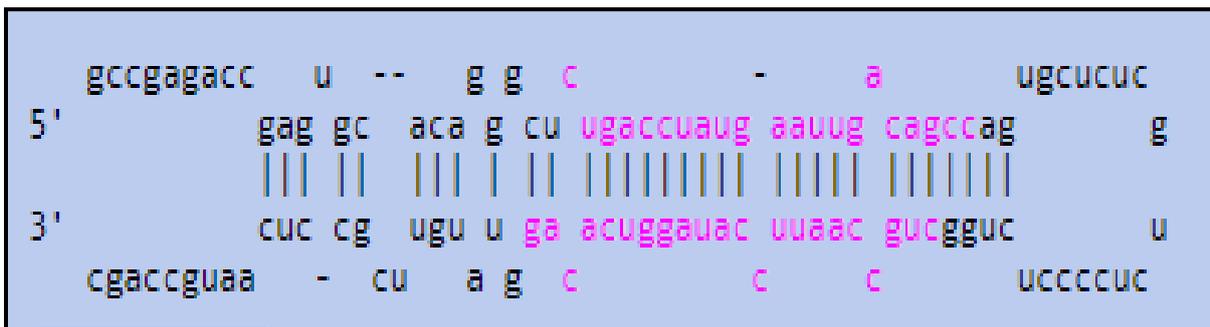


Figure 31: Structure en épingle en à cheveux de la séquence du miR-192.(Landgraf P *et al.*,2007)

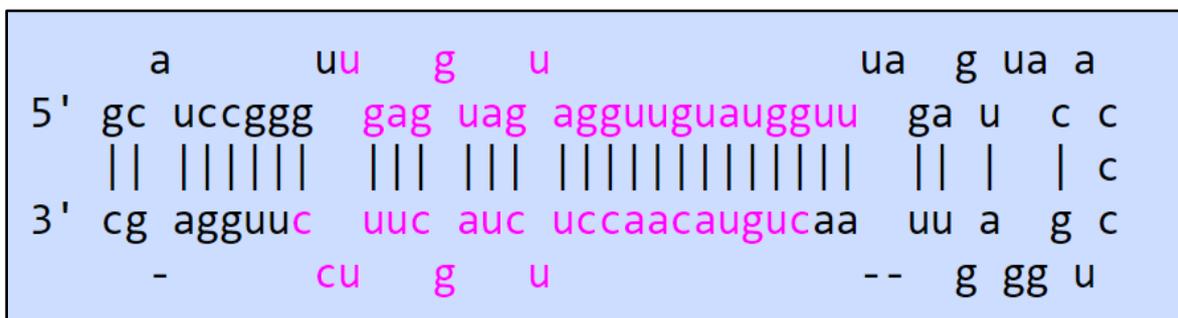


Figure 32: Structure en épingle en à cheveux de la séquence du miR-LET7C. (Landgraf P *et al.*,2007)

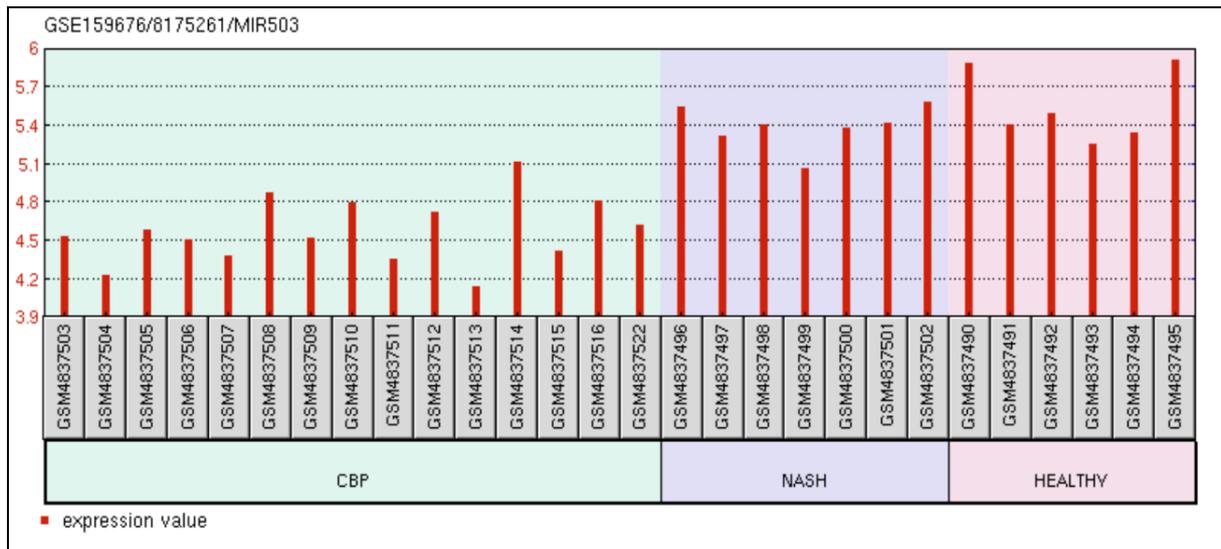


Figure 33 : Représentation par histogramme de miR-503 chez les 3 groupes étudiés (CBP,NASH, témoins sains).

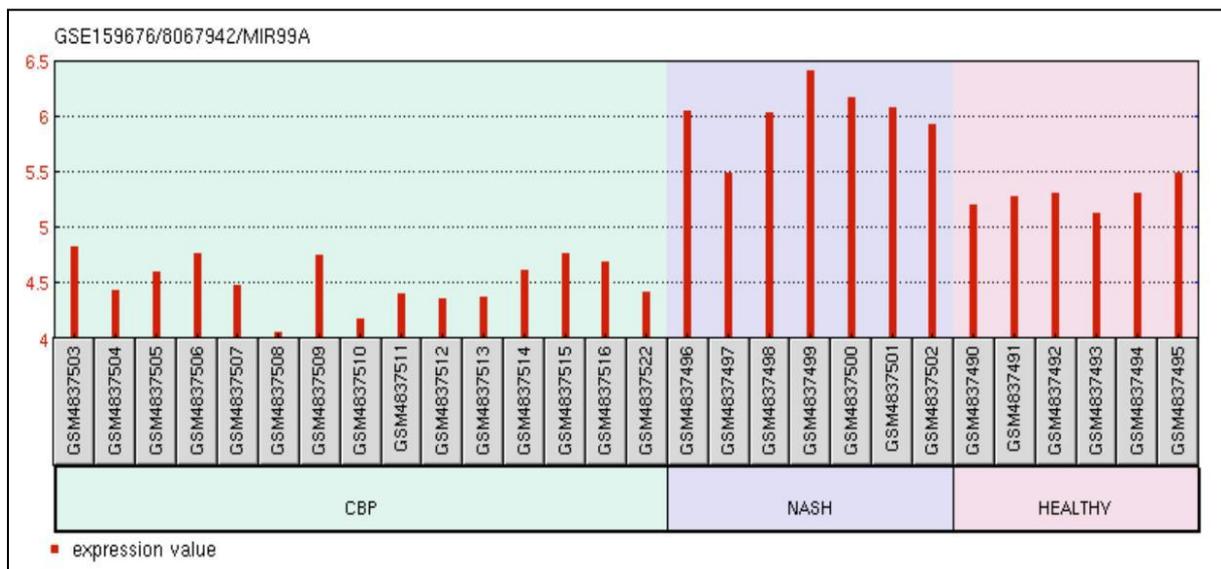


Figure 34: Représentation par histogramme de miR99A chez les 3 groupes étudiés (CBP,NASH, témoins sains).

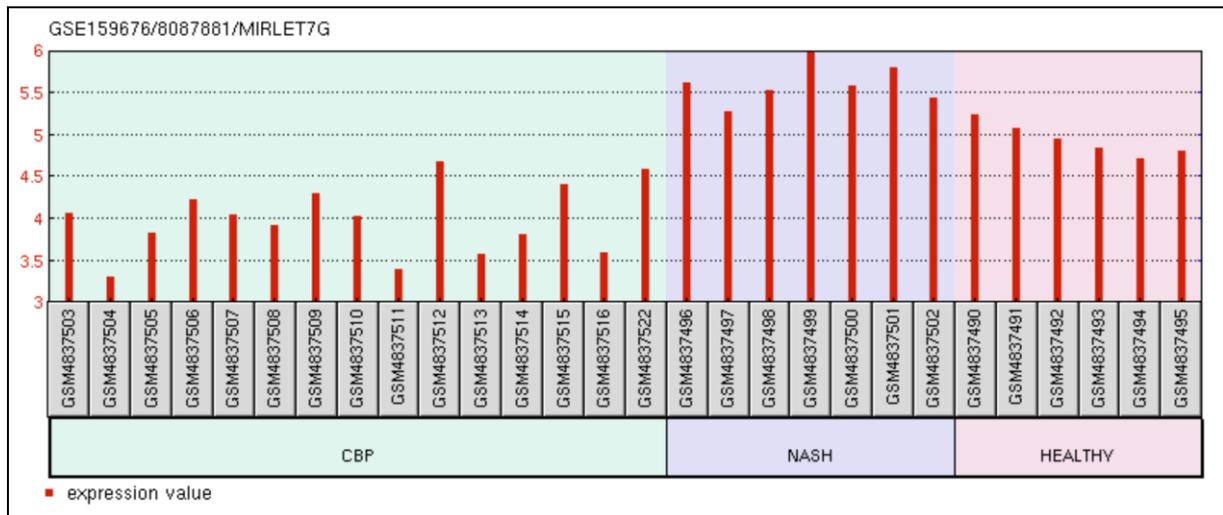


Figure 35 : Représentation par histogramme de miR-LET7G chez les 3 groupes étudiés (CBP,NASH, témoins sains).